

Analyse der Substratbindestelle, der Stöchiometrie und der Transportfunktion von S-Einheiten bakterieller ECF-Transporter

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

Lebenswissenschaftliche Fakultät

Dipl. Biol. Franziska Kirsch

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Thomas Eitinger
2. Prof. Dr. Erwin Schneider
3. Prof. Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2015

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Professor Dr. Thomas Eitinger in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Kirsch, F., Frielingsdorf, S., Pohlmann, A., Ziomkowska, J., Herrmann, A. & Eitinger, T. (2012). Essential amino acid residues of BioY reveal that dimers are the functional S unit of the *Rhodobacter capsulatus* biotin transporter. *Journal of Bacteriology* **194**, 4505-4512

Ziomkowska, J., Kirsch, F., Herrmann, A. & Eitinger, T. (2012). Analyse eines unkonventionellen Vitamintransporters. *Biospektrum* **18**, 493-496

Finkenwirth, F., Kirsch, F. & Eitinger, T. (2013). Solitary BioY proteins mediate biotin transport into recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **195**, 4105-4111

Finkenwirth, F., Kirsch, F. & Eitinger, T. (2014). A versatile *Escherichia coli* strain for identification of biotin transporters and for biotin quantification. *Bioengineered* **5**, 129-132

Yu, Y., Zhou, M., Kirsch, F., Xu, C., Zhang, L., Wang, Y., Jiang, Z., Wang, N., Li, J., Eitinger, T. & Yang, M. (2014). Planar substrate binding site dictates the specificity of ECF-type nickel/cobalt transporters. *Cell Research* **24**, 267-277

Kirsch, F. & Eitinger, T. (2014). Transport of nickel and cobalt ions into bacterial cells by S components of ECF transporters. *BioMetals* **27**, 653-660

Finkenwirth, F., Sippach, M., Landmesser, H., Kirsch, F., Ogienko, A., Grunzel, M., Kiesler, C., Steinhoff, H. J., Schneider, E. & Eitinger, T. (2015). ATP-dependent Conformational Changes Trigger Substrate Capture and Release by an ECF-type Biotin Transporter. *J Biol Chem* **290**, 16929-42

Zusammenfassung

Energy-Coupling-Factor (ECF)-Transporter sind Aufnahmesysteme für Vitamine und Übergangsmetallkationen in Prokaryoten und bilden eine Untergruppe der ABC-Transporter. Sie bestehen aus zwei unverwandten und nicht symmetrischen Membranproteinen, der substratspezifischen S-Komponente und der moderat konservierten, aber ubiquitären T-Komponente, sowie einem Paar von ABC-ATPasen. Die Kombination dieser beiden A-Einheiten mit der T-Komponente wird aus historischen Gründen als ECF bezeichnet. S-Komponenten für verschiedene Substrate besitzen hochgradig diverse Primärstrukturen, aber eine überraschend ähnliche Topologie.

Einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildeten Fragen zur kontrovers diskutierten Stöchiometrie der Untereinheiten von ECF-Transportern sowie zur zuvor postulierten Substrattransport-Funktion einzelner S-Komponenten auch ohne ECF. Als Untersuchungsobjekte dienten ein Biotintransporter (BioMNY) mit dem typischen Aufbau von ECF-Systemen, natürlicherweise in Organismen ohne ECF existierende biotinspezifische S-Einheiten (BioY) sowie zwei Vertreter der metallspezifischen ECF-Systeme. Die S-Einheit BioY des dreiteiligen Biotinimporters lag *in vitro* als Monomer und Dimer vor. Zugabe von Biotin in stöchiometrischer Menge begünstigte den monomeren Zustand. Der Nachweis des dimeren BioY steht in Einklang mit vorherigen und in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Studien, in denen oligomeres BioY in lebenden Bakterienzellen beobachtet wurde. Mit „Pull-down“-Experimenten wurde gezeigt, dass etwa 20 % der BioMNY-Komplexe die T-Komponente BioN als Dimer enthielten. Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden die 3D-Strukturen eines ECF mit drei verschiedenen S-Einheiten im substrat- und nukleotidfreien Zustand jeweils mit einer A₂T₁S₁-Stöchiometrie publiziert. Die S-Einheiten nehmen eine unerwartete, quer zur T-Einheit orientierte Position mit geöffneter Substratbindestelle ein. Inwieweit die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Dimerisierung der S- und T-Einheiten einen dynamisch auftretenden Zustand während des Transportzyklus repräsentiert, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Während für den größten Teil der S-Einheiten angenommen wird, dass sie als hochaffine Bindeproteine fungieren, bestätigten Wachstumsuntersuchungen die Transportfunktion von acht solitär vorkommenden BioY. Die *in vitro* auch für diese BioY-Proteine nachgewiesene Dimerisierung könnte die Transportfunktion von BioY ohne ECF erklären.

In einem zweiten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurden die metallspezifischen S-Einheiten CbiM/NikM untersucht. Sie interagieren mit ein bis zwei für die Transportfunktion essentiellen, zusätzlichen Transmembranproteinen (N oder K+L) und zeichnen sich durch eine Topologie mit sieben Transmembranhelices aus. Die Helices 2 bis 7 entsprechen der grundlegenden S-Einheiten-Topologie. Die durch externe Kooperationspartner ermittelte Kristallstruktur eines NikM bestätigte die durch Vorgängerarbeiten gezeigte

Beteiligung des extrem konservierten N-Terminus an der Metallbindung. Der weit in das Proteininnere hineinragende N-Terminus liefert mit dem Stickstoffatom der N-terminalen Aminogruppe, des Peptidrückgrates von Histidin 2 sowie des Imidazolrings von Histidin 2 drei der vier Metallliganden. Den vierten Liganden stellt das N δ 2-Atom des Imidazolrings von Histidin 67 dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die stabilisierende Funktion eines Netzes aus Wasserstoffbrückenbindungen für die Metallbindestelle von NikM bestätigt. Die Transportfunktion von CbiMN bzw. Nik(MN) ohne ECF wurde *in vivo* mittels des nickelabhängigen Enzyms Urease als Indikator für die intrazelluläre Nickelkonzentration verifiziert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch unklar, ob die für den Transport essentielle N-Komponente an der Substratbeladung der S-Einheit oder an der Substratfreisetzung beteiligt ist.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Transport über Membranen	- 1 -
1.2 ABC-Transporter	- 1 -
1.3 ECF-Transporter	- 3 -
1.4 ABC-ATPasen	- 6 -
1.5 Die Kopplung zwischen TMD und NBD	- 9 -
1.6 Substratbindung bei ABC-Transportern	- 12 -
1.7 Die Kopplung zwischen Substratbindung und Substrattransport	- 15 -
1.8 Die Stöchiometrie der Transporterkomplexe	- 15 -
1.9 Die S-Einheiten der metallspezifischen ECF-Transporter	- 17 -
1.10 Zielstellung	- 19 -
2. Ergebnisse	- 21 -
2.1 Eigenschaften biotinspezifischer S-Einheiten	- 21 -
2.1.1 Oligomerezustand verschiedener BioY-Proteine <i>in vitro</i>	- 21 -
2.1.2 Einfluss des Substrats auf die Oligomerisierung	- 27 -
2.1.3 Die Substratbindestelle von BioY	- 30 -
2.1.4 Herstellung eines künstlichen RcBioY-Dimers	- 32 -
2.1.5 Eigenschaften der BioY-Y-Dimere mit Aminosäureaustauschen	- 34 -
2.1.6 Oligomerisierung von RcBioY-Y <i>in vivo</i>	- 37 -
2.2 Einige BioY-Proteine besitzen Transporter-Funktion	- 39 -
2.3 Die Eigenschaften der S-Einheiten der Kobalt- und Nickeltransporter	- 47 -
2.3.1 Die Struktur von NikM	- 47 -
2.3.2 Die S-Einheit und ein zusätzliches Transmembranprotein stellen die minimale Transporteinheit dar	- 54 -
2.3.3 Eigenschaften von MN-Subkomplexen	- 57 -
2.4 Der Oligomerezustand der T-Einheit BioN	- 60 -
3. Diskussion	- 63 -
3.1 Struktur der ECF-Transporter und Funktion der S- und T-Untereinheiten	- 63 -
3.2 Die Transportaktivität von S-Einheiten in Abwesenheit eines ECF-Moduls	- 66 -
3.3 Wie ist die Transportfunktion von BioY erklärbar?	- 68 -
3.3.1 Die verschiedenen Mechanismen des <i>alternating-access</i> -Modells	- 68 -
3.3.2 Die Oligomerisierung von BioY	- 74 -
3.3.3 Substratfreisetzung durch BioY <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	- 79 -
3.4 Die Struktur der metallspezifischen S-Einheiten	- 82 -
3.5 Die potentielle Funktion der N-Komponente	- 90 -
3.6 Der Oligomerezustand der T-Einheit	- 93 -
4. Material und Methoden	- 95 -
4.1 Bakterienstämme	- 95 -
4.2 Verwendete Plasmide	- 95 -
4.3 Konstruktionsbeschreibung verwendeter Plasmide	- 98 -
4.3.1 Klonierung verschiedener Gene aus anderen Organismen in den <i>E. coli</i> -Vektor pBluescript II KS+	- 99 -
4.3.2 Konstruktion einer RcBioY-BioY-Tandem-Fusion	- 100 -
4.3.3 Konstruktion der inaktivierten RcBioY-Varianten D164N, K167R und K167Q	- 101 -
4.3.4 Konstruktion von RcBioY-BioY-Tandem-Fusionen mit einer oder zwei inaktivierten Domänen	- 101 -
4.3.5 Konstruktion von mYFP-Fusionsvarianten	- 101 -
4.3.6 Konstruktion von BioY ohne FLAG-tag (pH-RcBioY)	- 102 -

4.3.7	Konstruktion der Plasmide pH-RcBioN, pH-RcBioMN und pH-RcBioMNY jeweils ohne FLAG-tag.....	- 103 -
4.3.8	Konstruktion der Plasmide pRcNik(MN)-F sowie pRcNik(M _[H2Y] N)-F.....	- 104 -
4.3.9	Konstruktion von Plasmiden mit Streptomycin-Resistenz und ohne His-tag.....	- 104 -
4.3.10	Konstruktion der RcNik(MN)QO-Varianten mit verändertem NikM.....	- 105 -
4.4	Nährmedien und Antibiotika	- 106 -
4.5	Zellanzucht	- 108 -
4.6	Wachstumsanalysen.....	- 108 -
4.7	Glycerinkulturen	- 108 -
4.8	DNA-Präparation.....	- 109 -
4.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA im Schnellverfahren nach Sambrook & Russell (2001).....	- 109 -
4.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe eines Präparations-Kits.....	- 109 -
4.8.3	Isolierung von genomischer DNA, modifiziert nach Sambrook & Russell (2001)	- 110 -
4.9	Enzymatische Modifikation von DNA	- 110 -
4.9.1	Restriktion	- 110 -
4.9.2	Dephosphorylierung	- 110 -
4.9.3	Ligation.....	- 111 -
4.10	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	- 111 -
4.11	Präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen	- 111 -
4.12	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 112 -
4.13	Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR	- 114 -
4.14	Reinigung von PCR-Produkten	- 115 -
4.15	Übertragung von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	- 115 -
4.16	Isolierung von Proteinen.....	- 115 -
4.16.1	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	- 116 -
4.16.2	Isolierung von Membranproteinen aus <i>E. coli</i> -Zellen	- 116 -
4.17	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie	- 117 -
4.17.1	Affinitätschromatografie mittels Ni ²⁺ -NTA-Agarose (Qiagen).....	- 117 -
4.17.2	Affinitätschromatografie mittels Anti-FLAG-M2-Agarose (Sigma A2220)	- 118 -
4.17.3	Affinitätschromatografie mittels Strep-Tactin-Agarose	- 118 -
4.18	Umpuffern von Proteinlösungen.....	- 119 -
4.19	Größenausschluss-Chromatografie mittels eines Äkta-Systems.....	- 119 -
4.20	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	- 119 -
4.20.1	mittels einer modifizierten Lowry-Methode	- 119 -
4.20.2	mittels der Bradford-Methode (Bradford 1976)	- 120 -
4.20.3	mittels der BCA-Methode.....	- 120 -
4.21	Massenspektrometrie	- 120 -
4.22	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE.....	- 122 -
4.23	Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	- 123 -
4.24	Western-Blot und Immunodetektion von getaggten Proteinen	- 123 -
4.25	Messung der zellassozierten Radioaktivität in lebenden Zellen	- 125 -
4.25.1	Messung der [³ H]Biotinakkumulation durch rekombinante <i>E. coli</i> -Zellen.....	- 125 -
4.25.2	Messung der ⁶³ Ni ²⁺ - und ⁵⁷ Co ²⁺ -Akkumulation durch rekombinante <i>E. coli</i> -Zellen	- 125 -
4.26	Messung der Ureaseaktivität rekombinanter <i>E. coli</i> -Zellen nach Wolfram <i>et al.</i> 1995	- 126 -
4.27	Spektrometrische und mikroskopische Messung der Fluoreszenz-Anisotropie in lebenden Zellen ..	- 127 -
4.28	Chemikalien und Enzyme.....	- 130 -
4.29	Verwendete Software und Datenbanken.....	- 130 -
Literaturverzeichnis		- 131 -
Danksagung		- 139 -
Eidesstattliche Erklärung.....		- 141 -
Anhang.....		I

Abkürzungsverzeichnis

Å Angström	KAPA 7-Keto-8-Amino-Pelargonsäure
A280 Absorption (bei 280 nm)	kb Kilobasenpaare
ABC <i>ATP-binding-cassette</i> , ATP-Bindekassette	K_D Dissoziationskonstante
ACP , Acyl Carrier Protein	Km Kanamycin
Ap Ampicillin	LB Luria-Bertani
AP Alkalische Phosphatase	M Molar
APS Ammoniumperoxodisulfat	mYFP/ mCER <i>monomeric yellow fluorescent Protein, monomeric Cerulean</i>
ATP/GTP Adenosin/Guanosintriphosphat	NBD Nukleotidbindedomäne/-n
ADP Adenosindiphosphat	NBT p-Nitroblautetrazoliumchlorid
bp Basenpaare	NTA <i>nitrilotriacetic acid</i> , Nitrilotriessigsäure
BCA Bicinchoninsäure	OD optische Dichte in nm
BCIP 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat	ORF <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
BSA <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin	PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Cm Chloramphenicol	PCR Polymerase-Kettenreaktion
CTAB Cetyltrimethylammoniumbromid	PDB <i>protein data bank</i>
Da Dalton	r.m.s.d. <i>root-mean-square deviation</i>
DAPA 7,8-Diamino-Pelargonsäure	RNA Ribonukleinsäure
DMSO Dimethylsulfoxid	RNAse Ribonuklease
DM/DDM n-Decyl/ n-Dodecyl-β-D-maltopyranosid	rpm <i>rotation per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
DMF Dimethylformamid	PAR 4-(2-Pyridylazo)-Resorcinol
dpm <i>disintegrations per minute</i>	PIC Proteinase Inhibitor Cocktail
DNA Desoxyribonukleinsäure	Psi <i>pound-force per square inch</i>
DNase Desoxyribonuklease	SBP Substratbindeprotein
dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat	SEC-MALLS <i>size-exclusion chromatography - multi-angle laser light scattering</i>
ECF <i>energy coupling factor</i>	SDS Natriumdodecylsulfat
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	Sm Streptomycin
EPR <i>electron paramagnetic resonance</i> ; Elektronenspinresonanz	TBS Tris-Natriumchlorid
ESI-TOF-MS <i>electrospray ionization time-of-flight</i> Massenspektrometrie	TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>et al., et alteri</i> ; und andere	TMD Transmembrandomäne/-n
FRET Förster <i>resonance energy transfer</i>	TPE Tris-Phosphorsäure-EDTA
for/rev <i>forward/reverse</i>	Tween 20 Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
× g Erdbeschleunigung	U Unit
HPLC	UV Ultraviolett
HABA Hydroxy-Azophenyl-Benzoesäure	v/v Volumen pro Volumen
ICP-MS/ICP-OES <i>inductive coupled plasma</i> Massenspektrometrie/ optische Emmissionsspektrometrie	w/v Masse pro Volumen
IPTG Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	% v/v Volumenprozent
	% w/v Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1 Transport über Membranen

Die Abgrenzung aller Organismen von ihrer Umwelt erfolgt durch biologische Membranen. Zum Überleben ist jedoch eine Interaktion mit der Außenwelt erforderlich, welche über den Stoffaustausch durch die Zellmembranen gewährleistet wird. Der Durchtritt, sowohl in die Zelle als auch aus der Zelle hinaus, kann passiv erfolgen oder an die Nutzung einer Energiequelle gekoppelt sein. Sekundäre Transporter nutzen als Energiequelle für den Stofftransport elektrochemische Gradienten, während primäre Transporter die Freisetzung chemischer Bindungsenergien nutzen. Zu den primären Transportern gehören unter anderem die ATP-Bindekassetten (ABC) enthaltenden Transporter, welche durch die Hydrolyse von ATP Energie für den Transportvorgang bereitstellen. Eine Untergruppe der ABC-Transporter stellen die *Energy-Coupling-Factor* (ECF)-Transporter dar, welche Gegenstand dieser Arbeit sind.

1.2 ABC-Transporter

Die ABC-Transporter sind eine der größten und am weitesten verbreiteten Familien von Transportern. Sie kommen sowohl in Eukaryoten als auch in Bakterien und Archaeen vor und werden in der *Transporter-Classification-Database* (TCDB) in die Superfamilie 3.A.1 eingeordnet (Saier *et al.* 2014). Der Mensch besitzt 49 Gene, die für ABC-Transporter codieren (Vasilidou *et al.* 2009). *Escherichia coli* K12 enthält insgesamt vermutlich etwa 57 ABC-Transporter-Systeme (Linton & Higgins 1998), wobei laut NCBI-Datenbank sowie der EcoCyc Datenbank (Mackie *et al.* 2014) gegenwärtig die Funktion von 43 Systemen des *E. coli* K12-Stamms MG1655 bekannt ist. Pflanzengenome enthalten wesentlich mehr Gene, welche für ABC-Transporter codieren. Das Maisgenom enthält 109 für ABC-Transporter codierende Gene (Pang *et al.* 2013) und *Arabidopsis thaliana* besitzt 130 ABC-Transporter, von denen erst 22 funktionell analysiert sind (Kang *et al.* 2011). Betrachtet man die Zahl der für ABC-Transporter codierenden Gene in Relation zur Größe des Genoms, besitzen die Bakterien wesentlich mehr ABC-Transportergene als Archaeen oder Eukaryoten (Davidson *et al.* 2008, Ren & Paulsen 2005, Paulsen *et al.* 2000).

Die ABC-Transporter sind modular aufgebaut, setzen sich aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen (TMD) und zwei löslichen Nukleotidbindedomänen (NBD)

zusammen und der Komplex aus TMD und NBD ist das Kennzeichen der ABC-Transporter. Die sowohl in Struktur als auch in einzelnen Sequenzmotiven stark konservierten NBD, auch ABC-Module oder ATPasen genannt, binden und hydrolysieren ATP. Die aus der Assoziation bzw. Dissoziation der Nukleotide resultierenden Konformationsänderungen der NBD sind essentiell für den Transportvorgang. Die TMD verschiedener Organismen und auch verschiedener Transporter besitzen im Gegensatz zu den NBD untereinander nur wenig Sequenzähnlichkeit und zeigen daher ganz unterschiedliche Tertiärstrukturen. Basierend auf der Funktion der Transporterkomplexe sowie der Struktur und Größe der TMD, werden die ABC-Transporter in vier Klassen eingeteilt: Exporter, Importer I, Importer II und ECF-Transporter, oder auch Importer III genannt (ter Beek *et al.* 2014, Rice *et al.* 2014a). Importer kommen überwiegend in Prokaryoten sowie mit wenigen Ausnahmen in Pflanzen vor, während die Exporter in allen Domänen des Lebens zu finden sind (Holland 2011, Lee *et al.* 2008, Kretzschmar *et al.* 2011). Die Einteilung in die einzelnen Klassen erfolgt unter anderem aufgrund der Anzahl der Transmembranhelices der TMD. Die Importer I besitzen zusammengekommen 10-14 Transmembranhelices in beiden TMD, während Importer der Klasse II bis zu 20 Transmembranhelices aufweisen. Die TMD der Exporter bestehen aus insgesamt 12 Transmembranhelices (ter Beek *et al.* 2014, Eitinger *et al.* 2011, Zolnerciks *et al.* 2011, Cui & Davidson 2011). Die beiden TMD der ECF-Transporter, die T-Einheit und die S-Einheit, sind sowohl strukturell als auch funktionell sehr unterschiedlich (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Slotboom 2014, Zhang *et al.* 2014). Für unterschiedliche T-Einheiten wurden zwischen vier und acht Transmembranhelices vorausgesagt (Eitinger *et al.* 2011) und die S-Einheiten enthalten sechs (Zhang 2013) oder sieben Transmembranhelices (Yu *et al.* 2014). Die ECF-Transporter, welche die bisher jüngste entdeckte Gruppe der ABC-Transporter darstellen, weisen einen weiteren bedeutenden Unterschied zu den kanonischen ABC-Importern – also den Importern I und II – auf. Die kanonischen Importer benötigen zusätzlich ein extracytoplasmatisches, substratspezifisches Protein, auch Substratbindepotein (SBP) genannt, während die Substratspezifität der ECF-Transporter durch die membranständigen S-Einheiten vermittelt wird.

Die Domänen der kanonischen Importer sind sehr oft auf verschiedene Polypeptidketten verteilt, welche von einzelnen Genen codiert werden. Für die Bildung des funktionellen Transporters kommt es zur Ausbildung von homo- oder heterodimeren TMD beziehungsweise NBD. Im Falle der ECF-Transporter werden die beiden heterodimeren TMD und die NBD in den meisten Fällen von einzelnen Genen codiert und fusionierte TMD mit NBD sind die Ausnahme (Rodionov *et al.* 2009). Die NBD können Homo- und Heterodimere ausbilden, oder fusioniert vorliegen und eine der beiden TMD, die S-Einheit, kann auch aus mehreren

Polypeptidketten bestehen (Eitinger *et al.* 2011, Rodionov *et al.* 2009). In Exportern liegen entweder alle Domänen miteinander fusioniert in einer Polypeptidkette vor oder eine TMD und eine NBD sind miteinander als ein Homodimere ausbildendes Polypeptid fusioniert. Fusionsproteine aus zwei NBD wie zum Beispiel das RbsA des Ribosetransporters aus *E. coli* (Buckel *et al.* 1986, Barroga *et al.* 1996) können ebenso vorkommen.

Das Substratspektrum von ABC-Transportern ist sehr unterschiedlich und deckt insgesamt ein sehr breites Spektrum ab. Von Ionen und kleinen Molekülen bis hin zu großen Polypeptidketten können verschiedenste Substrate durch die entsprechenden spezifischen Transporter importiert oder exportiert werden (Saier 2000, Berntsson *et al.* 2010, Eitinger *et al.* 2011). Die ECF-Transporter sind auf den Import von wasserlöslichen Vitaminen und deren Vorstufen, Aminosäuren sowie nur in Spuren vorkommenden Übergangsmetallen spezialisiert (Eitinger *et al.* 2011, Rodionov *et al.* 2009). Beispielsweise importieren die in dieser Arbeit untersuchten ECF-Transporter das Vitamin Biotin beziehungsweise die Metallionen Kobalt und Nickel.

1.3 ECF-Transporter

Die Klasse der ECF-Transporter wurde durch vergleichende bioinformatische Analysen von circa 400 mikrobiellen Genomen entdeckt und aufgrund des Vorhandenseins zweier NBD den ABC-Transportern zugeordnet (Rodionov *et al.* 2006). Im Unterschied zu den anderen ABC-Transportern weisen die ECF-Transporter jedoch TMD auf, die völlig unterschiedliche Funktionen besitzen. Die S-Einheit vermittelt die Substratspezifität des Transporters und die T-Einheit bildet zusammen mit den beiden NBD – hier auch A-Einheiten genannt – das ECF-Modul, welches auch als Energetisierungsmodul bezeichnet wird (Slotboom 2014, ter Beek *et al.* 2014, Eitinger *et al.* 2011). Die A-Einheiten energetisieren durch ATP-Hydrolyse den Transportvorgang über einen bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus.

Der in dieser Arbeit behandelte Biotintransporter setzt sich aus einem Homodimer zweier ATPasen (BioM₂), der S-Einheit BioY und der T-Einheit BioN zusammen. Zur Stöchiometrie der TMD (BioY und BioN) existieren unterschiedliche Vorstellungen. In dieser Arbeit wurden weiterhin Kobalt- und Nickeltransporter bearbeitet. Das Energetisierungsmodul der Kobalttransporter setzt sich aus der T-Einheit CbiQ und einem Homodimer der A-Einheit CbiO zusammen. Für die Nickeltransporter wird die gleiche Nomenklatur verwendet, jedoch mit der Bezeichnung Nik anstelle von Cbi. Im Gegensatz zu anderen ECF-Transportern weisen die Metalltransporter zusätzlich zu den A- und T-Einheiten bis zu drei weitere membranständige Komponenten auf, welche als einzelne Polypeptidketten oder fusioniert

vorliegen können. Im Falle der Kobalttransporter handelt es sich um die Proteine CbiM und CbiN. Im Falle der Nickeltransporter handelt es sich um NikM und NikN; hier kommen auch häufig Nik(MN)-Fusionen vor oder NikN wird durch NikL und NikK ersetzt. Ob es sich um zweigeteilte bzw. dreigeteilte S-Einheiten handelt oder um S-Einheiten, die um zusätzliche Komponenten erweitert sind, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Die Bezeichnung „ECF, *Energy-Coupling-Factor*“ wurde schon in den 1970er Jahren für eine damals noch unbekannte Komponente verwendet, welche in *Lactobacillus casei* ebenso wie und zusätzlich zu einem jeweils substratspezifischen und heute als S-Einheit bezeichneten Membranprotein für die Aufnahme der wasserlöslichen Vitamine Folat, Thiamin und Biotin erforderlich war. Die Gruppe um G. Henderson, E. Zevely und F. Huennekens postulierte, dass der ECF die Hydrolyse von ATP mit dem Transportvorgang koppeln könnte (Henderson *et al.* 1976, Henderson *et al.* 1977a, Henderson & Zevely 1978, Henderson *et al.* 1979a, Henderson *et al.* 1979b).

Im Zuge der Untersuchung des Cobalamin-Biosyntheseweges in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium wurden während der Sequenzierung des *cob*-Operons mit den darin enthaltenen Synthesegenen für Cobalamin auch die Gene *cbiM*, *cbiN*, *cbiQ* und *cbiO* identifiziert, die mit dem Transport von Kobalt in Verbindung gebracht wurden. CbiO wurde aufgrund seiner typischen ATP-Bindemotive als ABC-ATPase identifiziert, wohingegen eine Suche nach homologen Proteinen für CbiN und CbiQ in der Datenbank zum damaligen Zeitpunkt erfolglos blieb (Roth *et al.* 1993). In den vergleichenden genomischen Analysen, die zur Beschreibung der ECF-Transporter führten, wurde die Gruppe der Kobalttransporter CbiMNQO anhand der Kollokalisierung ihrer Gene mit 5'-positionierten Vitamin B₁₂-Riboswitches identifiziert. Die Gruppe der Nickeltransporter NikMNQO bzw. NikKLMQO wurde anhand der Bindestellen für den nickelabhängigen Repressor NikR oder NikR-ähnliche Repressoren im 5'-Bereich der entsprechenden Operons identifiziert (Rodionov *et al.* 2006, Rodionov *et al.* 2009).

In den vergleichenden genomischen Analysen von Rodionov *et al.* (2006, 2009) wurden Homologe von *cbiO*- und *cbiQ*-Genen in vielen prokaryotischen Genomen unmittelbar benachbart zu Genen für Membranproteine (S-Einheiten) mit ursprünglich unbekannter Funktion gefunden. Die zunächst hypothetisch und später in vielen Fällen experimentell verifizierte Zuordnung dieser S-Komponenten zu einem Substrat erfolgte aufgrund des Vorhandenseins regulatorischer Elemente wie vitaminsensierende Riboswitches oder Bindestellen für Repressoren mit bekannter Funktion wie beispielsweise BirA im Falle der Biotintransporterproteine. Auch die genomische Kollokalisierung mit Genen für die Vitaminsynthese wurde als Indikator herangezogen (Rodionov *et al.* 2009).

Die postulierte Spezifität bestimmter Vitamintransporter wurde durch die Verfolgung des Wachstums vitaminuxotropher und intrinsisch vitamintransportdefizienter *E. coli*-Stämme untersucht, die den jeweiligen Transporter enthielten und in Gegenwart von Spuren eines definierten Vitamins kultiviert wurden. Metallaufnahmemessungen in lebenden Zellen bestätigten die Spezifität der Metalltransporter. Die Nickelaufnahme durch NikMNQO aus *Rhodobacter capsulatus* und *S. Typhimurium* konnte in *E. coli* ebenso gezeigt werden wie die Kobalt- und Nickelaufnahme durch die CbiMNQO-Systeme aus beiden Organismen (Rodionov *et al.* 2006). Unter Verwendung der radioaktiv markierten Vitamine Riboflavin, Thiamin, Folat und Biotin wurde mittels Messung der zellgebundenen Radioaktivität die Spezifität der S-Einheiten RibU, ThiT, FolT beziehungsweise BioY gezeigt (Burgess *et al.* 2006, Rodionov *et al.* 2009, Hebbeln *et al.* 2007). Das Wachstum eines pantothenat-uxotrophen und transportdefizienten *E. coli*-Stamms auf Pantothenat war nur bei Produktion des ECF-Transporters mit Pantothenat-spezifischer S-Einheit PanT möglich. Gleiches galt für das Wachstum eines folatauxotrophen und natürlicherweise transportdefizienten *E. coli*-Stamms bei Vorhandensein des ECF-Transporters mit der S-Einheit FolT (Neubauer *et al.* 2009).

Die ECF-Transporter werden in die Subklassen I und II unterteilt. Die beiden Subklassen sind in Abbildung 1 anhand einiger Beispiele dargestellt. Die Transporter der Subklasse I werden in einem Operon codiert, welches ein oder zwei verschiedene Gene für die A-Einheiten, ein Gen für die T-Einheit und ein Gen für die S-Einheit enthält. Die A-Einheiten können auch miteinander fusioniert vorkommen. Meist besteht die S-Einheit nur aus einem Protein, doch in einigen Fällen konnte zu Beginn der vorliegenden Arbeit die S-Einheit nicht genau definiert werden, da im Operon neben den für A- und T-Einheit codierenden Genen zwei oder drei weitere Gene vorhanden waren. Im Falle der Nickel- und Kobalttransporter codierten diese Gene für ein Membranprotein mit sieben vorhergesagten Transmembranhelices sowie ein oder zwei weitere, kleinere Membranproteine mit unbekannter Funktion. Im Falle des hypothetischen Cobalamintransporters in Organismen wie *Moorella thermoacetica* und *Bacillus cereus* interagiert die S-Einheit CbrT möglicherweise mit ein oder zwei hypothetischen Lipoproteinen (Eitinger *et al.* 2011).

Im Gegensatz zur Subklasse I liegen die für die S-Einheiten codierenden Gene der Subklasse II verteilt im Genom vor und teilen sich dasselbe Energetisierungsmodul aus einer T- und zwei verschiedenen A-Einheiten.

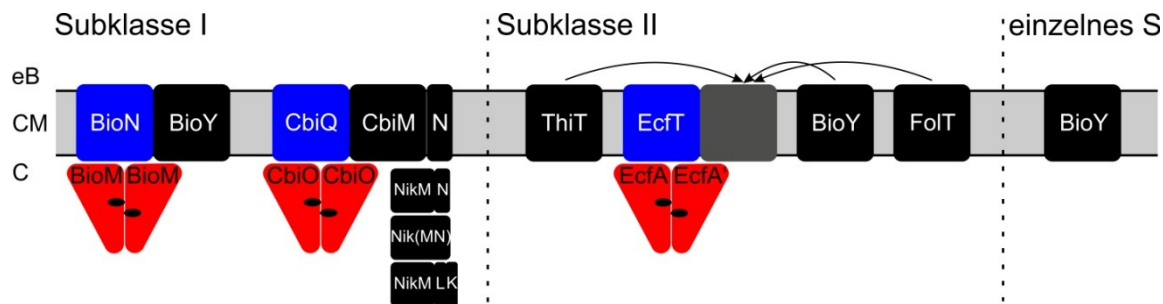


Abbildung 1: Modularer Aufbau der ECF-Transporter. ECF-Transporter der Subklassen I und II bestehen aus zwei identischen (BioM, CbiO), homologen (EcfA+A') oder fusionierten (nicht abgebildet) A-Einheiten (rot), einer T-Einheit (BioN, CbiQ, EcfT; blau) und einer S-Einheit (BioY, ThiT, FolT; schwarz). Die S-Einheit kann in seltenen Fällen zweigeteilt (Cbi/NikM+Cbi/NikN), dreigeteilt (NikM+NikL+NikK) oder mit der zusätzlichen Einheit fusioniert (Nik(MN)) vorliegen. Die A-Einheiten (ABC-ATPasen) binden höchstwahrscheinlich zwei ATP (schwarze Ellipsen) und bilden zusammen mit der T-Einheit das Energetisierungsmodul. Die Transporter der Subklasse I werden von Genen codiert, die sich in einem Operon befinden und jede S-Einheit besitzt ihr spezifisches Energetisierungsmodul. In Subklasse II werden die Untereinheiten des Energetisierungsmoduls in einem Operon codiert und die Gene der verschiedenen S-Einheiten liegen im Genom verstreut vor. Die S-Einheiten teilen sich alle dasselbe EcfAA'T (Pfeile). Ausschließlich die S-Einheit BioY existiert in manchen Organismen ohne erkennbare Gene für das Energetisierungsmodul im Genom. eB: extrazellulärer Bereich, CM: Cytoplasmamembran (grau), C: Cytoplasma.

Viele Organismen besitzen ECF-Transporter beider Subklassen (Rodionov *et al.* 2009) und manche Organismen enthalten mehrere – teilweise bis zu zwölf – verschiedene S-Einheiten, die sich dasselbe ECF-Modul teilen (ter Beek *et al.* 2011). Aktinobakterien und Archaeen besitzen mehr Systeme aus der Subklasse I als aus der Subklasse II und in Proteobakterien finden sich ausschließlich Subklasse I-Systeme. Dagegen besitzen *Firmicutes*, die mit 68 % den größten Anteil an ECF-Transportern innerhalb der analysierten Bakterien und Archaeen enthalten, Vertreter beider Subklassen, während *Thermotogae* fast ausschließlich Systeme aus der Subklasse II aufweisen. Zusätzlich wurden *bioY*-Gene in Organismen identifiziert, in deren Genom keine Gene für T-Einheiten existieren. Solche einzeln vorkommenden BioY-Proteine sind in Proteobakterien und einigen Aktinobakterien oder in Archaeen zu finden (Eitinger *et al.* 2011, Slotboom 2014).

1.4 ABC-ATPasen

Ein Charakteristikum aller ABC-Transporter sind die ATP-Bindekassetten der NBD. Die NBD sind die am stärksten konservierten Domänen der ABC-Transporter und weisen die typischen Sequenzmotive für die ATP-Bindung und eine konservierte Tertiärstruktur auf. Eine NBD besteht aus einer RecA-ähnlichen, katalytischen Subdomäne und einer kleineren helikalen

Subdomäne mit vier α -Helices (Oswald *et al.* 2006, Zolnerciks *et al.* 2011, ter Beek *et al.* 2014). Die NBD einiger weniger kanonischer ABC-Importer besitzen eine zusätzlich C-terminale Domäne mit regulatorischer Funktion (ter Beek *et al.* 2014, Biemans-Oldehinkel *et al.* 2006) wie beispielsweise MalK des Maltose/Maltodextrintransporters aus *E. coli* (Bordignon *et al.* 2010). Die bisher kristallisierten A-Einheiten der ECF-Transporter weisen alle ebenfalls eine zusätzliche C-terminale Domäne auf und es konnte gezeigt werden, dass diese Domänen sowohl bei kanonischen ABC-Importern als auch bei ECF-Transportern für die Ausbildung der Homo- bzw. Heterodimere verantwortlich sind (Bordignon *et al.* 2010, Karpowich & Wang 2013). Die A-Einheiten EcfA und EcfA' von *Lactobacillus brevis* (PDB: 4hzu, 4huq, 4rfs) (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014) und *Thermotoga maritima* (PDB: 4hlu, 2yz2) (Karpowich & Wang 2013) kristallisierten als Heterodimer, während NikO von *Thermoanaerobacter tengcongensis* (PDB: 4mki) (Chai *et al.* 2013) als Homodimer kristallisierte. CbiO1 von *Clostridium perfringens* (PDB: 3gfo) besitzt die C-terminale Domäne ebenfalls, wurde jedoch als Monomer kristallisiert, weshalb in diesem Fall kein Rückschluss auf die Beteiligung der C-terminalen Domäne an einer möglichen Dimerisierung gezogen werden kann.

Die Dimerisierung, welche für die A-Einheiten des Biotintransporters BioM durch Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analysen bei Anwesenheit der T- und der S-Einheit *in vivo* bestätigt werden konnte (Finkenwirth *et al.* 2010), erfolgt durch Aneinanderlagerung der A-Einheiten in Kopf-Schwanz-Richtung. An der Kopplungsstelle der Dimere können zwei Moleküle ATP über die konservierten Bindemotive koordiniert werden, die in Abbildung 2 hervorgehoben sind. Die RecA-ähnliche Subdomäne enthält den A-Loop, der mit einer konservierten, aromatischen Aminosäure bei der Positionierung des ATP hilft (ter Beek *et al.* 2014). Das mit dem β - und γ -Phosphat des ATP interagierende Walker A-Motiv (GXXGXGKS/T, X jede beliebige Aminosäure) ist ebenfalls in dieser Subdomäne lokalisiert. Weiterhin befindet sich hier das Walker B-Motiv ($\Phi\Phi\Phi\Phi$ D, Φ eine hydrophobe Aminosäure) mit einem terminalen Aspartat zur Bindung des zur Hydrolyse des ATP nötigen Kofaktors Mg^{2+} . Direkt daran schließt sich das „katalytische Carboxylat“ an – ein konserviertes Glutamat, welches an der Initiierung der ATP-Hydrolyse beteiligt ist (Moody *et al.* 2002, Oldham *et al.* 2007). Die RecA-ähnliche Subdomäne enthält außerdem den H-Loop und den D-Loop. Das konservierte Histidin des H-Loop interagiert zum einen mit dem γ -Phosphat des ATP und zum anderen indirekt über ein konserviertes Aspartat im D-Loop (SALD) mit dem ATP an der entgegengesetzten ATP-Bindestelle (Zaitseva *et al.* 2005). In der helikalen Subdomäne dient das konservierte Signatur-Motiv LSGGQ zur Interaktion mit dem γ -Phosphat des ATP (Schneider & Hunke 1998). Die RecA-ähnliche und die helikale

Subdomäne sind über den aus etwa acht Aminosäuren bestehenden Q-Loop mit einem konservierten Glutamin am N-Terminus miteinander verbunden. Das Glutamin interagiert mit dem Mg^{2+} (Davidson *et al.* 2008) und dem γ -Phosphat des ATP (Oldham & Chen 2011a). Eine ATP-Bindestelle besteht aus dem Signatur-Motiv und dem D-Loop der einen Domäne sowie dem Walker A-Motiv, dem Walker B-Motiv und den A-, H- und Q-Loops der anderen Domäne (Zoghbi & Altenberg 2014, ter Beek *et al.* 2014, Locher 2009).

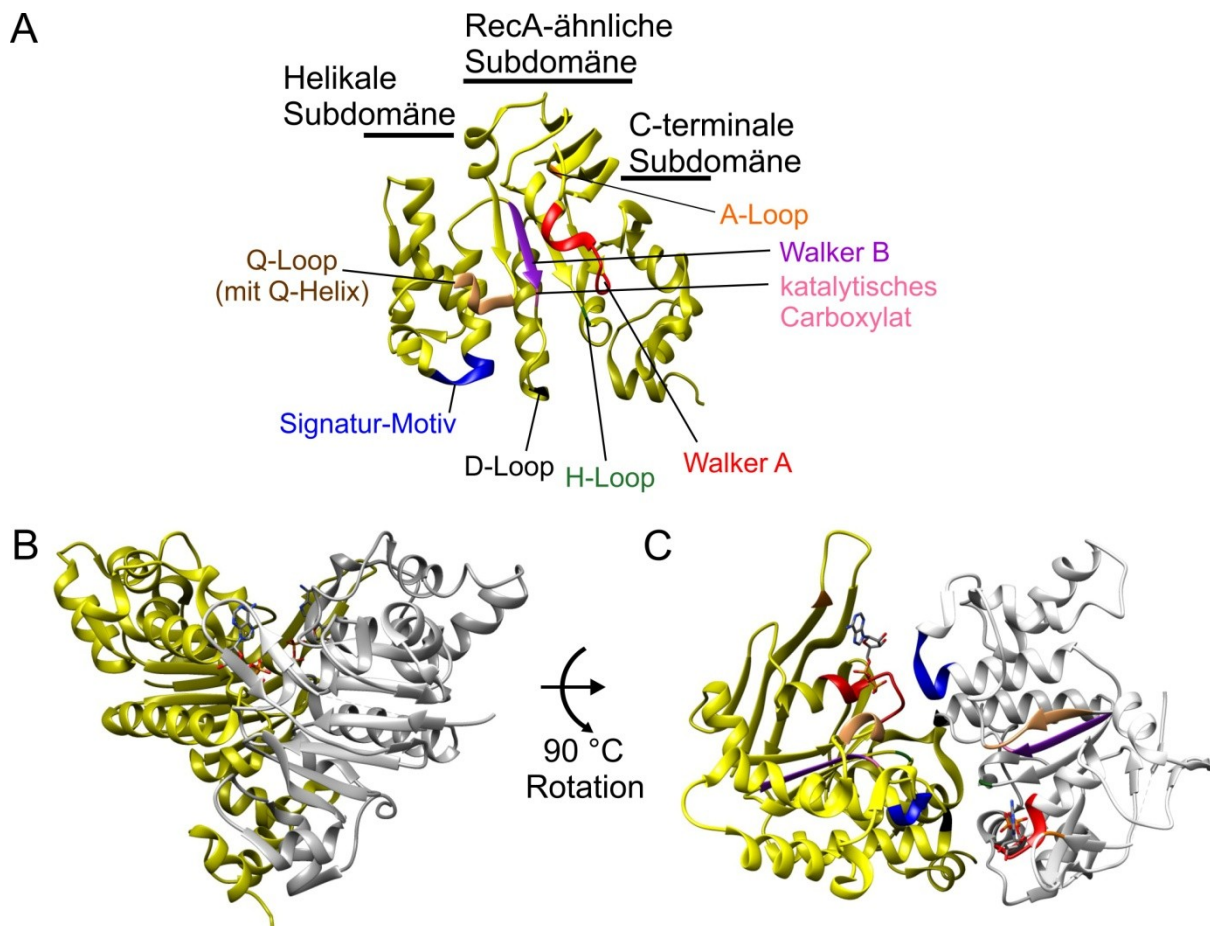


Abbildung 2: 3D-Modell der A-Einheit (ABC-ATPase). Dargestellt ist (A) das monomere, nukleotidfreie EcfA und (B) und (C) ein ADP-gebundenes Heterodimer aus EcfA (gold) und EcfA' (silber) aus *Thermotoga maritima*, wobei das Dimer in (C) um 90 °C gedreht abgebildet ist (PDB: 4hlu, Karpowich & Wang 2013). Die im Text beschriebenen Domänen und konservierten Motive sind in A und C farbig hervorgehoben und in A entsprechend beschriftet. In B und C ist das gebundene ADP (N: blau, O: rot, P: orange) dargestellt. Die Strukturen wurden mit Chimera 1.7 bearbeitet.

Ausschließlich bei den ECF-ATPasen existiert eine helikale Schlaufe innerhalb des Q-Loop mit dem Konsensus XPD/EXQ Φ (Φ eine hydrophobe Aminosäure), welche Q-Helix genannt wird. In der Q-Helix befinden sich der konservierte, saure Aminosäurerest und das konservierte Glutamin auf gegenüberliegenden Seiten. Der konservierte, saure Rest bildet eine

Salzbrücke mit dem konservierten Argininrest aus, welcher unmittelbar dem LSGGQ-Motiv folgt (Karpowich & Wang 2013).

Die Bindung des ATP bewirkt den Übergang der NBD-Dimere von einer sogenannten geöffneten Konformation hin zu einer geschlossenen Konformation, in der die NBD dicht aneinander gelagert sind (ter Beek *et al.* 2014). Spektroskopische Untersuchungen des zum Leucin/Isoleucin/Valin-Transporter LivFGMH aus *E. coli* homologen Transporters aus *Methanocaldococcus jannaschii* zeigten deutlich, dass für die Ausbildung des ATP-NBD-Dimer-Sandwiches und für die ATP-Hydrolyse zwei gebundene ATP-Moleküle nötig sind, dass aber die Hydrolyse eines ATP-Moleküls anschließend wieder zur Öffnung des Komplexes führt (Zoghbi & Altenberg 2014, Zoghbi & Altenberg 2013). Die Freisetzung von ADP und P_i bewirkt eine interne Konformationsänderung der NBD. Bei der ATP-Bindung bewegen sich die RecA-ähnliche und die helikale Subdomäne aufeinander zu und nach der Hydrolyse wieder voneinander weg, wodurch auch der Q-Loop seine Position stark verändert. Die NBD interagieren direkt über die Q-Loops mit den TMD, die Konformationsänderung überträgt sich auf die TMD und dadurch wird der Substrattransport ermöglicht (ter Beek *et al.* 2014).

1.5 Die Kopplung zwischen TMD und NBD

Die ABC-Exporter sowie die kanonischen ABC-Importer enthalten zwei TMD, die im Falle der Homodimere identisch und im Falle der Heterodimere pseudosymmetrisch sind. Die Anzahl der Transmembranhelices ist zwischen den einzelnen Transporterkategorien stark unterschiedlich und schwankt besonders innerhalb der Importer I stark. Die TMD der Importer I bestehen jeweils aus fünf bis sechs Helices, können aber auch bis zu acht Helices besitzen wie beispielsweise MalF des Maltosetransporters MalEFGK₂ aus *E. coli*. Die TMD der Importer II sind mit jeweils zehn Helices größer, während die Exporter sechs Transmembranhelices pro TMD aufweisen (ter Beek *et al.* 2014, Zolnerciks *et al.* 2011, Cui & Davidson 2011). Für die Importer I und II konnte anhand der Kristallstrukturen nachgewiesen werden, dass die beiden TMD zusammen eine Pore bilden, durch die das Substrat in die Zelle transportiert werden kann. Für die Exporter existiert bisher keine mit Substrat gebundene Kristallstruktur, aber es wird vermutet, dass auch hier die TMD eine Translokationspore bilden (ter Beek *et al.* 2014).

Im Unterschied zu den oben genannten Transportern weisen die ECF-Transporter zwei strukturell völlig unterschiedliche TMD auf. Die S-Einheit wird ab Kapitel 1.6 behandelt. Für die T-Einheiten wurden zwischen vier und acht Transmembranhelices vorausgesagt (Eitinger *et al.* 2011). Die T-Einheit des bisher einzigen vollständig kristallisierten ECF-Moduls wies

fünf Transmembranhelices auf (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Da die T-Einheiten in den einzelnen Organismen nur moderat konserviert sind, kann die Topologie anderer T-Einheiten von der nun bekannten Topologie abweichen. Die Vermutung einer Substrat-Translokationspore zwischen der T- und der S-Einheit (Erkens *et al.* 2011, Erkens *et al.* 2012) wurde durch die auf Basis der Kristallstruktur des kompletten ECF-Transporters der Subklasse II entwickelte Hypothese eines völlig neuen Transportmechanismus ersetzt. Dieser Mechanismus basiert auf der Kippung der S-Einheit zwischen einem zum Periplasma hin ausgerichteten und einem zum Cytoplasma hin ausgerichteten Zustand (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014, Zhang 2013, Slotboom 2014).

Die Kopplung der Konformationsänderungen der NBD nach ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse mit dem Transportmechanismus ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit bei allen ABC-Transportern identisch. Die TMD der kanonischen Importer und Exporter sowie die T-Einheiten der ECF-Transporter besitzen mindestens eine sogenannte Kopplungshelix im cytoplasmatisch lokalisierten Proteinteil, mit der sie im Bereich des Q-Loop mit den NBD interagieren (Wen & Tajkhorshid 2011). Diese kurze α -Helix passt genau in den Bereich der NBD zwischen RecA-ähnlicher und helikaler Subdomäne und die Konformationsänderungen des Q-Loop können über die Kopplungshelices auf die Transmembrandomänen übertragen werden. Dies führt dazu, dass bei ATP-Bindung eine nach innen geschlossene und nach außen geöffnete Konformation der TMD möglich ist, die sich nach ATP-Hydrolyse in eine nach außen geschlossene und nach innen geöffnete Konformation ändert. Dies konnte in den Kristallstrukturen des Maltosetransporters MalEFGK₂ von *E. coli* beobachtet werden, welcher zu den Importern I zählt. Der Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂F, der ein sehr gut charakterisiertes Mitglied der Importer II darstellt, weist hingegen in Abwesenheit von ATP die nach außen geöffnete Konformation auf (ter Beek *et al.* 2014, Zolnerciks *et al.* 2011). Die kanonischen ABC-Importer besitzen nur eine Kopplungshelix, wodurch eine TMD mit einer NBD gekoppelt ist. Die Exporter besitzen pro TMD je zwei Kopplungshelices in den cytoplasmatischen Loops. Da in Exportern das Phänomen des *domain swapping* auftritt, wobei zwei Membranhelices einer TMD zusammen mit den vier Membranhelices der anderen TMD ein Helixbündel bilden (Dawson & Locher 2006), interagieren jeweils die beiden Kopplungshelices einer TMD mit beiden NBD (ter Beek *et al.* 2014, Holland 2011, Zolnerciks *et al.* 2011).

Auch die T-Einheit der ECF-Transporter besitzt zwei helikale Bereiche, in denen der Kopplungsbereich mit der A-Einheit enthalten ist. Es handelt sich dabei um zwei kurze XRX-Motive mit einem konservierten Argininrest und Alanin, Leucin, Valin, Serin oder Methionin an Position 1 bzw. Glycin oder Serin an Position 3 (Eitinger *et al.* 2011). Die XRX-Motive

befinden sich nahe des C-Terminus der T-Einheiten in zwei cytoplasmatischen Helices. Die Veränderung eines oder beider Motive in der T-Einheit eines EcfT der Subklasse II und des BioN des Subklasse I-Biotintransporters zeigte, dass die Motive für die intramolekulare Signalweiterleitung und die Komplexstabilität der Holotransporter verantwortlich sind (Neubauer *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2014). Durch chemische Vernetzungsexperimente konnte die Interaktion der Arginin-Motive in BioN mit einem dem Q-Loop C-terminal benachbarten Bereich von circa 13 Aminosäuren in BioM bestätigt werden (Neubauer *et al.* 2011). Im kristallisierten EcfAA'T-Heterodimer aus *Thermotoga maritima* wurde eine von der Q-Helix und dem benachbarten C-terminalen Bereich ausgebildete Vertiefung im Interaktionsbereich der beiden Proteine beobachtet (Karpowich & Wang 2013). Die Daten der chemischen Vernetzungsexperimente zwischen BioM und BioN sowie die strukturellen Beobachtungen des EcfAA'T aus *T. maritima* deuteten darauf hin, dass der Kopplungsbereich zwischen der A- und der T-Einheit in dieser Furche liegt. Im vollständig kristallisierten Energetisierungsmodul EcfAA'T aus *Lactobacillus brevis* – dargestellt in Abbildung 3 – zeigte sich, dass die Arginine der beiden XRX-Motive über ionische Wechselwirkungen mit einem Aspartat innerhalb des dem Q-Loop benachbarten Bereiches interagieren (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014).

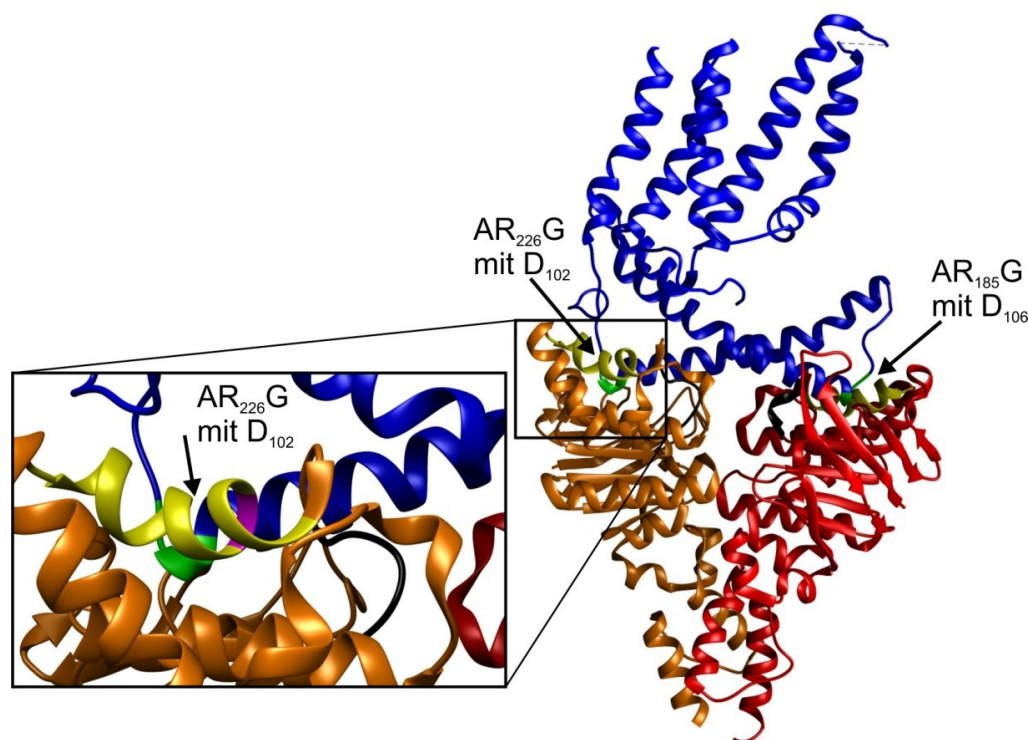


Abbildung 3: 3D-Modell des Energetisierungsmoduls EcfAA'T aus *Lactobacillus brevis*. Die Interaktion der T-Einheit (blau) erfolgt über die XRX-Motive (grün) mit konserviertem Arginin 185 oder 226 über ionische Wechselwirkungen mit dem Aspartat 106 in EcfA (rot) oder 102 in EcfA' (orange). Die Vergrößerung zeigt einen der beiden Aspartatreste (violett), welcher sich in der C-terminal des Q-Loop (schwarz) gelegenen Kopplungsregion (gelb) befindet. Die Interaktionsstellen sind durch Pfeile markiert. Die Struktur von *LbEcfAA'T* (PDB: 4huq) wurde mit Chimera 1.7 bearbeitet.

Chemische Vernetzungsexperimente mit BioN des BioMNY-Komplexes aus *R. capsulatus* deuteten außerdem an, dass ein Teil von BioN im Komplex als Homodimer vorkommt (Neubauer *et al.* 2011). Auch Koreinigungsexperimente mit dem Subklasse II-Transporter EcfAA'T-RibU aus *Streptococcus thermophilus* deuteten auf eine Oligomerisierung der T-Einheit im Komplex hin (Karpowich & Wang 2013). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage der Stöchiometrie der T-Einheit weiter verfolgt.

1.6 Substratbindung bei ABC-Transportern

Die Substratspezifität wird bei den verschiedenen Typen der ABC-Transporter auf sehr unterschiedliche Art vermittelt. Im Falle der Exporter ist bisher nur wenig über mögliche Substratbindestellen innerhalb der TMD bekannt, da bisher keine Kristallstrukturen mit gebundenem Substrat existieren. Mutageneseexperimente und chemische Verknüpfungsexperimente am P-Glycoprotein der Maus geben Hinweise darauf, dass spezifische

Aminosäuren der TMD für die Substratinteraktion essentiell sind (Li *et al.* 2014, Loo *et al.* 2006a, Loo *et al.* 2006b).

Die kanonischen ABC-Importer sind auf lösliche Proteine, die SBP, angewiesen. Bisher konnte nur im Falle des Maltose/Maltodextrintransporters aus *E. coli* in der TMD MalF eine Substratbindestelle nachgewiesen werden und diese funktioniert zusätzlich, aber nicht anstelle des SBP (Oldham *et al.* 2007, Schneider *et al.* 2012, ter Beek *et al.* 2014). Die SBP kommen in gramnegativen Bakterien hauptsächlich frei im periplasmatischen Raum vor, während sie in grampositiven Bakterien und Archaeen über N-terminale Lipidanker oder eine N-terminale hydrophobe Helix fixiert sind oder fusioniert an die TMD vorliegen (für einen Überblick Eitinger *et al.* 2011). Die Größe der SBP kann zwischen 25 und 70 kDa betragen; sie besitzen nur geringe Sequenzähnlichkeiten und die Tertiärstruktur ist bis zu einem gewissen Grad sehr ähnlich und hochkonserviert. Eine N-terminale und eine C-terminale globuläre Domäne sind über eine *hinge*-Region, in der sich die Substratbindetasche befindet, miteinander verbunden (Quiocho & Ledvina 1996). Die Bindung des Substrats mit einer Affinität zwischen K_D 0,01 und 1 μ M (Eitinger *et al.* 2011) führt zur Ausbildung und Stabilisierung einer geschlossenen Konformation des SBP (Fulyani *et al.* 2013), was als „Venusfliegenfallen“-Modell bezeichnet wird (Mao *et al.* 1982). Trotz der hohen Ähnlichkeiten der SBP in der Tertiärstruktur konnten sie basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten und Unterschieden in sechs Gruppen eingeordnet werden. Die Unterscheidung erfolgte hauptsächlich über die *hinge*-Region, welche als einzelne α -Helix, als drei nicht-helikale Bereiche, als zwei kurze Stränge mit einer Länge von 4-5 Aminosäuren oder als zwei längere Stränge bestehend aus 8-10 Aminosäuren auftreten kann (Berntsson *et al.* 2010).

Die Substratspezifität der ECF-Transporter wird nicht durch SBP vermittelt, sondern durch die S-Einheiten. Es handelt sich dabei um 20 bis 25 kDa große, membranständige Proteine, welche mit Ausnahme der metallspezifischen S-Einheiten sechs Transmembranhelices ausbilden. Obwohl die verschiedenen S-Einheiten, selbst jene aus demselben Organismus, auf der Sequenzebene nur geringe Ähnlichkeiten von 10 bis maximal 20 % aufweisen (Slotboom 2014), besitzen sie sehr ähnliche Strukturen mit *root-mean-square-deviation* (r.m.s.d.)-Werten zwischen 2,5 und 3,1 Å bei mindestens 150 verglichenen Ca-Atomen (analysiert mit DALI, Holm & Rosenstrom 2010). In Abbildung 4 sind die 3D-Modelle der bisher kristallisierten S-Einheiten der Vitamintransporter dargestellt.

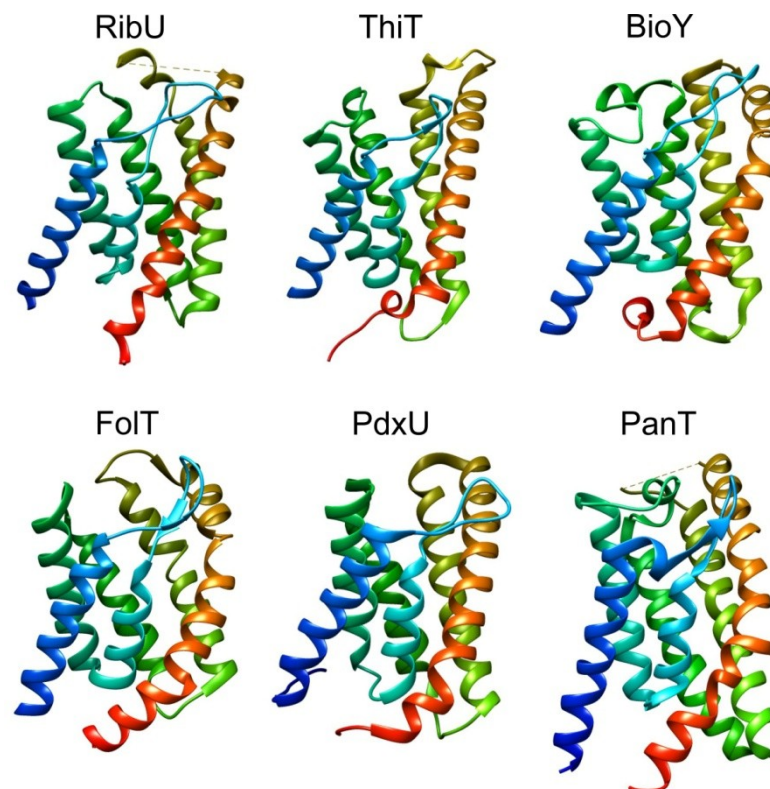


Abbildung 4: 3D-Modelle verschiedener S-Einheiten. Strukturen der Subklasse II-S-Einheiten RibU (PDB: 3p5n), ThiT (PDB: 3rlb), BioY (PDB: 4dve), FolT (PDB: 4huq), PdxU (PDB: 4hzu) und PanT (PDB: 4rfs) im Apozustand. Es wurde eine Blau-zu-Rot-Regenbogenfärbung über alle sechs Transmembranhelices genutzt, beginnend am N-Terminus (blau) bis zum C-Terminus (rot). Alle PDB bearbeitet mit Chimera 1.7.

Innerhalb der ECF-Transporter konnten bisher 21 verschiedene substratspezifische S-Familien identifiziert werden (Slotboom 2014). Fünf dieser Familien gehören ausschließlich zur Subklasse I und ihre Vertreter interagieren jeweils mit ihrem eigenen Energetisierungsmodul. Dazu gehören CbiM und NikM mit der Spezifität für Kobalt beziehungsweise Nickel, MtaT und MtaS mit postulierter Spezifität für Methioninvorstufen (wie Methylthioadenosin) oder S-Adenosylmethionin, sowie YkoE mit vermuteter Spezifität für die Thiaminvorstufe Hydroxymethylpyrimidin. Die S-Einheiten CbrT, HtsT und QrtT, welche hauptsächlich mit ihrem eigenen ECF-Modul interagieren und daher Vertreter der Subklasse I darstellen, besitzen auch Homologe – besonders in *Firmicutes* –, die sich als Vertreter der Subklasse II mit anderen S-Einheiten ein Energetisierungsmodul teilen. Vertreter anderer Familien von S-Einheiten gehören ausschließlich oder aber mit nur wenigen Ausnahmen zur Subklasse II. BioY nimmt eine Sonderstellung ein, da die Mitglieder dieser Gruppe je zu einem Drittel den Subklassen I oder II zugeordnet oder einzeln in den Organismen codiert sind (Eitinger *et al.* 2011). Für die bisher experimentell untersuchten S-Einheiten zeigte sich eine sehr hohe Substrataffinität mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren bis subnanomolaren Bereich (Duurkens *et al.* 2007, Eudes *et al.* 2008, Erkens & Slotboom 2010, Berntsson *et al.* 2012).

1.7 Die Kopplung zwischen Substratbindung und Substrattransport

Die mit dem Substrat beladenen SBP der kanonischen ABC-Importer interagieren mit den TMD, indem jeweils eine der beiden globulären Domänen mit einer TMD interagiert. Die Interaktionen zwischen SBP und TMD bewirken Konformationsänderungen der TMD. Diese übertragen sich über die Kopplungshelices der TMD auf die NBD und bewirken eine Annäherung der NBD zueinander. Die Bindung von ATP bewirkt die Dimerisierung der NBD. Die anschließende ATP-Hydrolyse und darauffolgende Dissoziation von ADP führt wiederum zur Konformationsänderung der NBD und TMD, was den Transport des Substrats ermöglicht (ter Beek *et al.* 2014, Rice *et al.* 2014a, Böhm *et al.* 2013).

Im Falle der ECF-Transporter ist die T-Einheit für die Kopplung der durch ATP-Bindung induzierten Konformationsänderung der A-Einheit mit dem Substrattransport verantwortlich, indem sie die Konformationsänderung auf die S-Einheit überträgt. Die S-Einheit interagiert nicht direkt mit der A-Einheit, sondern nur indirekt über die T-Einheit (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013). Bei Abwesenheit der T-Einheit, gleichzeitiger Veränderung der beiden Kopplungsmotive XRX in der T-Einheit oder Veränderung des dem Q-Loop C-terminal benachbarten Aspartats in den A-Einheiten ist die Interaktion der T- und A-Einheiten gestört und somit die Komplexbildung der Holotransporter nicht möglich (Karpowich & Wang 2013, Neubauer *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2014). Die Interaktion zwischen S- und T-Einheit könnte über ein konserviertes AXXXA-Motiv (X jede beliebige Aminosäure) in der ersten Transmembranhelix der S-Einheiten erfolgen. Aminosäureaustausche der konservierten Alanine zu Tryptophan führten in ThiT aus *Lactococcus lactis* zur Komplexinstabilität und dadurch zur Inaktivität der Subklasse II-Transporter-Varianten (Erkens *et al.* 2011). Der Subklasse I-Transporter BioMNY aus *R. capsulatus* wurde ebenfalls durch Veränderungen des A₁₂A₁₃XXV₁₆A₁₇-Motivs in BioY destabilisiert und Biotinimport konnte nicht mehr beobachtet werden (Kiesler 2013).

1.8 Die Stöchiometrie der Transporterkomplexe

Alle ABC-Transporter bestehen aus zwei TMD und zwei NBD, unabhängig davon, ob und in welcher Weise die Domänen miteinander fusioniert vorliegen. Die Anzahl der Domänen eines funktionellen Importers kann jedoch auch größer als 2:2 sein. Die kanonischen ABC-Importer besitzen in den meisten Fällen zusätzlich genau ein SBP und sind zum Import von nur einem spezifischen Substrat befähigt. Ihre Stöchiometrie erhöht sich somit auf 2:2:1, selbst in den Ausnahmefällen, in denen mehr als ein spezifisches Substrat transportiert wird. Der Import

von mehr als einem Substrat kann entweder durch die Bindung von mehreren Substraten an dasselbe SBP erfolgen – wie zum Beispiel LAO, welches Lysin, Arginin und Ornithin erkennt – oder die Transporter interagieren mit zwei verschiedenen SBP, jedoch nicht zeitgleich. Ein Beispiel für letzere Variante ist der Histidintransporter HisQMP₂ aus *S. Typhimurium*, welcher mit den SBP, HisJ und LAO interagiert und somit Histidin, Lysin, Arginin und Ornithin importieren kann (Heuveling *et al.* 2014, Schneider *et al.* 2012, Ames 1986). Es existieren jedoch auch Importer wie der Aminosäuretransporter GlnPQ, bei dem zwei Substratbindedomänen im Tandem an die TMD GlnP fusioniert vorliegen. Eine der Substratbindedomänen hat eine höhere Affinität zu Asparagin, die andere zu Glutamin. Der funktionelle, homodimere Transporter besitzt somit vier Substratbindedomänen und damit eine Stöchiometrie von 2:2:4 (Fulyani *et al.* 2013).

Die ECF-Transporter setzen sich in den meisten Fällen vermutlich ebenfalls aus zwei NBD (A-Einheiten) und zwei TMD (einer T-Einheit und einer S-Einheit) zusammen, auch wenn bis zu 12 verschiedene S-Einheiten um die Interaktion mit demselben Energetisierungsmodul konkurrieren (ter Beek *et al.* 2011, Rodionov *et al.* 2009). Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass zwei gleiche oder auch zwei verschiedene S-Einheiten gleichzeitig an das ECF-Modul binden können (Karpowich & Wang 2013). Dies wirft die Frage nach der Stöchiometrie der ECF-Transporter auf, die noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen ist. Die Stöchiometrie von A₁:A'₁:T₁:S₁ der ATP- und substratfreien Kristallstruktur des EcfAA'T-FolT, EcfAA'T-PdxU bzw. EcfAA'T-PanT aus *L. brevis* (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014) steht der durch Karpowich und Wang (2013) postulierten Stöchiometrie von A₂:T₂:S₂ gegenüber. In den asymmetrischen Einheitszellen der kristallisierten S-Einheiten RibU, ThiT und BioY wurden Dimere beziehungsweise Trimere der Proteine gefunden (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012). *In vivo*-Experimente mit dem Biotintransporter aus *R. capsulatus*, welcher im Gegensatz zu den zuvor genannten Transportern einen Vertreter der Subklasse I darstellt, deuteten ebenfalls auf oligomere S- und T-Einheiten hin. Hetero-FRET-Untersuchungen zeigten eine Oligomerisierung des BioY sowohl allein als auch im Komplex mit seinem spezifischen Energetisierungsmodul (Finkenwirth *et al.* 2010), während chemische Vernetzungsexperimente mit BioN im BioMNY-Komplex oligomerisiertes BioN zeigten (Neubauer *et al.* 2011). Möglicherweise unterscheiden sich die Vertreter der verschiedenen Subklassen in der Stöchiometrie ihrer Untereinheiten.

Besonders interessant ist die Oligomerisierung von BioY, würde sie doch eine mögliche Erklärung für die beobachtete Funktion von BioY in Abwesenheit des ECF-Moduls liefern. Rekombinante Zellen, welche ausschließlich BioY enthielten, waren mit hoher Kapazität zur

Akkumulation von radioaktiv markiertem Substrat in der Lage (Hebbeln *et al.* 2007). Dies wurde als Resultat der Transportaktivität von BioY interpretiert. Weiterhin müssen die BioY-Proteine berücksichtigt werden, welche in Organismen ohne EcfT-Einheiten codiert vorliegen, sich aber auf Sequenzebene nicht von den Homologen unterscheiden, die ein eigenes ECF-Modul besitzen oder sich eines mit anderen S-Einheiten teilen. Für Zellen, die eines dieser einzelnen BioY-Proteine aus *Chlamydia* spp. enthielten, konnte ebenfalls die Biotinakkumulation nachgewiesen werden (Fisher *et al.* 2012). Die S-Einheiten sind mit sechs Transmembranhelices sehr kleine Proteine und eine Substrat-Translokationspore konnte in den bisher kristallisierten S-Einheiten nicht gefunden werden (Erkens *et al.* 2011, Erkens *et al.* 2012, Song *et al.* 2013). Andere Biotinimporter wie der sekundäre Transporter YigM aus *E. coli* (Ringlstetter 2010), der natriumabhängige Multivitamintransporter (SMVT) aus Säugerzellen (Zempleni *et al.* 2009; Fisher *et al.* 2012) oder der protonenabhängige Symporter aus den Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* (Stolz 2003, Stolz *et al.* 1999) besitzen 10 bis 12 Transmembranhelices und sind somit wesentlich größer als monomeres BioY. Eine Kernfrage der vorliegenden Arbeit war deshalb, ob BioY einen dimeren Zustand einnimmt und ob dieser relevant für die Funktion ist.

1.9 Die S-Einheiten der metallspezifischen ECF-Transporter

Außer BioY wurde auch dem CbiMN-Anteil von CbiMNQO-Systemen Transportaktivität ohne Beteiligung des ECF-Moduls zugeschrieben. Gefolgt wurde dies aus Co^{2+} -Aufnahmemessungen mit rekombinanten Zellen, welche ausschließlich CbiMN enthielten und das radioaktiv markierte Substrat akkumulierten (Rodionov *et al.* 2006). Das Fehlen von CbiN in den Varianten CbiMQO und CbiM führte zur vollständigen Inaktivität und zeigte deutlich, dass CbiN essentiell ist (Rodionov *et al.* 2006), obwohl dieses Protein nur lose an den CbiMQO-Komplex assoziiert (Siche *et al.* 2010). Wird CbiM mit CbiN künstlich zu Cbi(MN) fusioniert, beeinflusst dies die Aktivität im Vergleich zu CbiMN nicht, bewirkt aber, dass die fusionierte S-Einheit ebenfalls nur noch locker an das ECF-Modul CbiQO gebunden ist (Siche 2010). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch unklar, wie genau die S-Einheit der metallspezifischen ECF-Transporter definiert ist, da neben den A- und T-Einheiten jeweils zwei bis drei Membranproteine im Operon codiert sind. In Abbildung 5 sind diese Membranproteine der Kobalt- und Nickeltransporter dargestellt. Für CbiM bzw. NikM werden sieben Transmembranhelices vorhergesagt. Sie unterscheiden sich von den vitamin-spezifischen S-Einheiten durch eine zusätzliche N-terminale Transmembranhelix und besitzen im Falle von CbiM in vielen Fällen ein Signalpeptid. Der N-Terminus der reifen CbiM- und

NikM-Proteine ist extrazellulär lokalisiert. Für CbiN, NikN sowie NikL werden zwei Transmembranhelices und für NikK eine Transmembranhelix vorhergesagt. CbiM und CbiN werden bis auf eine Ausnahme mit fusioniertem Cbi(MN) (*Geobacter sulfurreducens*) von zwei getrennt codierten Polypeptidketten gebildet. Nik(MN) kommt dagegen in vielen Fällen auch als fusioniertes Protein vor. Weiterhin kann NikN durch das eine ähnliche Topologie aufweisende NikL ersetzt sein und fast alle NikMLQO-Systeme besitzen zusätzlich NikK. Dabei existieren weder zwischen CbiN und NikN noch zwischen NikL, NikN und CbiN größere Sequenzähnlichkeiten (Rodionov *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2009).

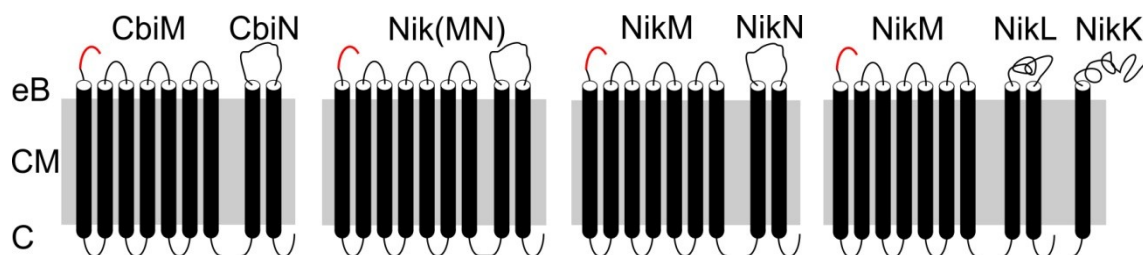


Abbildung 5: Topologiemodell der S-Einheiten der Metalltransporter. CbiM und NikM besitzen sieben vorhergesagte Transmembranhelices. Der hochkonservierte N-Terminus ist rot markiert. CbiN, NikN oder NikL bilden vermutlich zwei Transmembranhelices aus, während NikK meist durch eine Helix membrangebunden vorliegt. eB: extrazellulärer Bereich, CM: Cytoplasmamembran (grau), C: Cytoplasma.

Gemein ist allen CbiM- und NikM-Proteinen der hochkonservierte N-Terminus mit den Konsensussequenzen $_1\text{MHIMEGFLP}_9$ (CbiM) und $_1\text{MHIPDGFLS}_9$ (NikM). Die essentielle Funktion der konservierten N-terminalen Aminosäuren für die Substratakkumulation wurde für den Kobalttransporter nachgewiesen. Nahezu alle Varianten des künstlich fusionierten und aktiven Cbi(MN) aus *R. capsulatus* mit Austausch, Insertionen oder Deletionen der N-terminalen Aminosäuren in CbiM waren inaktiv. In diesen Experimenten zeigte sich, dass neben der Sequenz auch die Länge des N-Terminus kritisch für die Funktion des Transporters war. Insbesondere das Vorhandensein des Histidin 2 sowie der Abstand zwischen His2 und der N-terminalen Aminogruppe der Peptidkette hatte starken Einfluss auf die Metallakkumulation und könnte für die Bindung der Metallionen essentiell sein (Siche *et al.* 2010). Da auch im Falle von Zellen mit dem Nik(MN)QO-Komplex das Vorhandensein von His2 essentiell für die Metallakkumulation war (Hebbeln 2008), wurde vermutet, dass His2 an der Ausbildung der Substratbindestelle beteiligt ist. Welche anderen Aminosäurereste für die Bindung der Metallionen essentiell sind, war Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit.

1.10 Zielstellung

Zur Stöchiometrie der S- und T-Einheiten in ECF-Transportern, insbesondere innerhalb der Subklasse I, gibt es keine einheitliche Auffassung. Darüber hinaus war zu Beginn dieser Arbeit die Frage ungeklärt, ob die in vorangegangenen Untersuchungen beobachtete Akkumulation radioaktiven Biotins oder radioaktiver Metallionen durch Zellen, die BioY bzw. CbiMN oder NikMN ohne ihre zugehörigen A- und T-Einheiten enthielten, tatsächlich Transport in die Zellen oder möglicherweise Bindung an die Oberfläche repräsentiert.

Untersuchungen zur Stöchiometrie der membrangebundenen Untereinheiten wurden an BioMNY durchgeführt – einem der Modellsysteme für ECF-Transporter der Subklasse I. Die Fragestellung wurde durch quantitative „Pull-down“-Experimente, die Konstruktion eines kovalent verknüpften BioY-Dimers, die massenspektrometrische Quantifizierung der Biotinbindung an BioY und durch FRET-Experimente *in vivo* analysiert.

Zur Unterscheidung zwischen Substratbindung an die Zelloberfläche und Substratimport durch S-Einheiten wurden zum einen die Grundlagen für einen physiologischen Test etabliert, bei dem die Zellvermehrung mit der intrazellulären Biotinverfügbarkeit korreliert. Zum anderen wurde die Aktivität eines cytoplasmatischen, nickelabhängigen Enzyms als Indikator für die intrazelluläre Nickelkonzentration genutzt.

Ein weiteres Ziel war es, tiefergehende Einblicke in den Mechanismus metallspezifischer ECF-Transporter zu gewinnen. Hier kam insbesondere ortsspezifische Mutagenese kombiniert mit Metallaufnahmemessungen zum Einsatz. Dieser Teil der Arbeit wurde durch die Ermittlung der Kristallstruktur einer NikM-Komponente durch externe Kooperationspartner maßgeblich bereichert.

2. Ergebnisse

2.1 Eigenschaften biotinspezifischer S-Einheiten

BioY, die S-Einheiten der biotinspezifischen ECF-Transporter, liegen mit circa 20 kDa und sechs Transmembranhelices im gleichen Größenbereich wie auch die meisten anderen S-Einheiten. BioY-Proteine können entweder mit einem spezifischen Energetisierungsmodul interagieren oder sich mit anderen S-Einheiten ein ECF-Modul teilen. In manchen Organismen existieren jedoch solitäre BioY-Proteine, da diese Organismen keine Gene für ein ECF-Modul enthalten. BioY-Proteine binden Biotin mit einer sehr hohen Affinität im subnanomolaren Bereich (Berntsson *et al.* 2012). Vorangegangene kinetische Untersuchungen der Aufnahme radioaktiven Biotins in rekombinanten *E. coli*-Zellen, die BioY aus *R. capsulatus* ohne dessen BioMN-Modul enthielten (und wie alle *E. coli* K12- und B-Stämme keine Komponenten von ECF-Transportern besitzen), hatten sättigbare Substratakkumulation gezeigt; diese wurde als Biotinaufnahme in die Zellen interpretiert (Hebbeln *et al.* 2007). Es stellte sich die Frage, ob BioY im monomeren Zustand mit nur sechs transmembranen Helices diese Funktion ausüben kann oder ob hierfür oligomere Zustände erforderlich sind. RcBioY-Oligomere wurden durch Hetero-FRET-Analysen in lebenden Zellen beobachtet (Finkenwirth *et al.* 2010). Zur vertiefenden Untersuchung dieser Frage wurden die Oligomierzustände verschiedener BioY-Proteine im gereinigten Zustand analysiert.

2.1.1 Oligomierzustand verschiedener BioY-Proteine *in vitro*

2.1.1.1 RcBioY

Um zu untersuchen, ob RcBioY als stabiles Oligomer vorliegt, wurde ein „Pull-down“-Verfahren mittels Affinitätschromatografie durchgeführt. Hierzu wurden rekombinante *E. coli*-Zellen verwendet, die entweder N-terminal His-getaggt BioY ($_H$ Y) oder C-terminal FLAG-getaggt BioY ($_F$ Y) oder eine Kombination der beiden unterschiedlichen Proteine enthielten. Nach Zellaufschluss, Isolierung und anschließender Solubilisierung der Membranen wurden die Solubilisate zunächst an die Ni^{2+} -NTA-Matrix chromatografiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE mit darauf folgender Coomassiefärbung beziehungsweise darauf folgendem Western-Blot mit entweder Anti-Oligo-His- oder Anti-FLAG-Antikörpern analysiert. Die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass (i) $_H$ Y erwartungsgemäß in Gegenwart wie

in Abwesenheit von Y_F an die Matrix gebunden hatte, (ii) Y_F nicht an diese Matrix gebunden war, aber (iii) in Gegenwart von ${}_HY$ mit diesem koeluierte. Diese Resultate waren ein starker Hinweis auf oligomeres BioY. Allerdings ließ der qualitative immunologische Nachweis von Y_F keine quantitative Aussage darüber zu, in welchem Umfang ${}_HY$ - Y_F -Komplexe vorlagen.

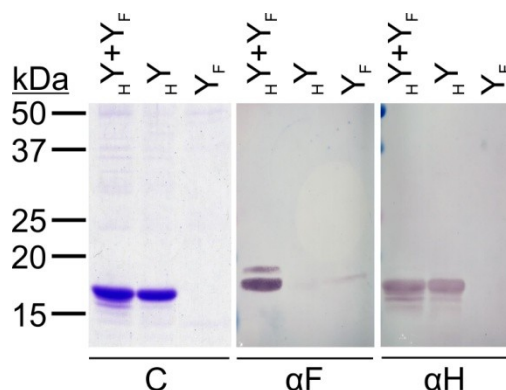


Abbildung 6: Koreinigung von FLAG-getaggtm BioY (Y_F) mit His-getaggtm BioY (${}_HY$). Solubilisate mit den einzelnen Proteinen oder einer Kombination beider Proteine wurden über die Ni^{2+} -NTA-Matrix chromatografiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE mit Coomassiefärbung (C) bzw. Western-Blot mit Anti-FLAG- (αF) oder Anti-Oligo-His-Antikörpern (αH) analysiert.

Diese Frage wurde in einer weiteren Serie von Experimenten untersucht, deren Ergebnisse in Abbildung 7 zusammengefasst sind. Hierbei wurde die ${}_HY + Y_F$ -enthaltende Probe zunächst über die Ni^{2+} -NTA-Matrix (1H) und anschließend über die FLAG-spezifische Matrix (2F) chromatografiert oder umgekehrt (1F, 2H). Zur Ermöglichung der Quantifizierung des Dimers über SDS-PAGE und Coomassiefärbung, wurde die Proteinmenge eines Aliquots 1 des konzentrierten und umgepufferten Eluats nach Chromatografie 1 mit derjenigen eines Aliquots 2 des konzentrierten und umgepufferten Eluats nach Chromatografie 2 verglichen. Das Volumen des Aliquots 2 wurde so gewählt, dass es unter Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen Auftragsvolumen vor Chromatografie 2 und Endvolumen des filtrierten und umgepufferten Eluats dem Volumen des Aliquots 1 entsprach. Ebenso wurde das Volumen des Aliquots 3 eingestellt, welches den aufgefangenen Durchfluss während Chromatografie 2 enthielt.

Konkret wurden im Falle von 1H/2F 300 μ l des Eluats nach der Ni^{2+} -NTA-Chromatografie (1H) an der FLAG-spezifischen Matrix chromatografiert und der Durchfluss (2F_{Df}) wurde aufgefangen. 100 μ l dieses Durchflusses sowie weitere 100 μ l des Eluats 1H wurden jeweils mit SDS-Probenpuffer versetzt und je 1/6 wurde per SDS-PAGE aufgetrennt. Somit war jeweils 1/18 der Probenmenge, die auf die FLAG-spezifische Matrix gegeben wurde, in den entsprechenden Spuren auf dem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel enthalten (Abbildung 7 A).

an der jeweiligen Affinitätschromatografie könnte zur bevorzugten Ausbildung von ${}_H Y-{}_H Y$ - bzw. Y_F-Y_F -Komplexen geführt haben, die durch das hier verwendete Verfahren aber nicht als Dimere identifiziert werden konnten.

2.1.1.2 Oligomerzustand anderer BioY-Proteine *in vitro*

Um zu untersuchen, ob auch andere BioY-Proteine Oligomere bilden, wie dies zum Beispiel für das solitäre BioY aus *Chlamydia* spp. *in vitro* beobachtet wurde (Fisher *et al.* 2012), wurden elf weitere BioY-Proteine aus acht verschiedenen Organismen in *E. coli* produziert, gereinigt und per Gelfiltration auf ihre Oligomerzustände hin untersucht. Es wurden BioY-Proteine beider ECF-Subklassen sowie solitäre BioY-Vertreter aus den folgenden Organismen genutzt: *Agrobacterium tumefaciens* (AtBioY) und *Sinorhizobium meliloti* (SmBioY) (beide Subklasse I); *Lactococcus lactis* (LlBioY1 und LlBioY2, Subklasse II); *Roseobacter denitrificans* (RdBioY), *Bradyrhizobium japonicum* (BjBioY), *Rhodopseudomonas palustris* (RpBioY), *Silicibacter pomeroyi* (SpBioY1 und SpBioY2) und *Oceanicola batsensis* (ObBioY1 und ObBioY2) (alle solitär).

Alle rekombinant in *E. coli* produzierten Proteine besaßen einen N-terminalen His-tag sowie einen C-terminalen FLAG-tag. Die Proteine wurden aus Membranen solubilisiert und vor der Größenausschluss-Chromatografie über die Ni^{2+} -NTA-Matrix isoliert. Zur Kontrolle der isolierten Proteine in Bezug auf proteolytischen Abbau wurden die Eluate mittels SDS-PAGE und darauf folgender Coomassiefärbung bzw. darauf folgendem Western-Blot mit Anti-Oligo-His- oder Anti-FLAG-Antikörpern analysiert. In Abbildung 8 ist zu sehen, dass ausschließlich SpBioY2 einen starken Abbau des Monomers zeigte. Weithin wiesen alle zwölf BioY-Proteine neben dem Monomer bei 18-22 kDa eine höher laufende, SDS-resistente, oligomere Form auf. Diese konnte teilweise schon deutlich durch die Coomassiefärbung, mindestens aber durch die sensitivere Antikörperdetektion beobachtet werden.

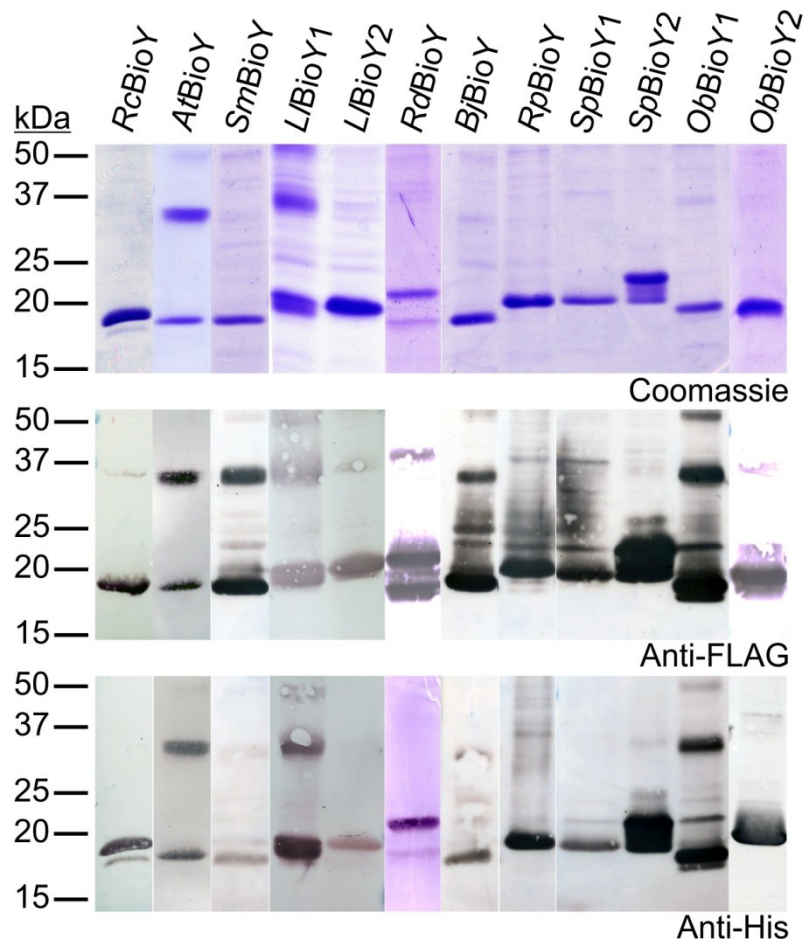


Abbildung 8: Oligomerzustände verschiedener BioY-Proteine aus neun verschiedenen Organismen nach SDS-PAGE. Die über die Ni^{2+} -NTA-Matrix chromatografierten His- und FLAG-getaggten Proteine wurden nach SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt oder nach Immunoblot mittels Anti-FLAG oder Anti-His detektiert. Alle monomeren BioY liefen auf einer Höhe von 18-22 kDa. Niedriger laufende Banden deuteten auf Abbau, höher laufende Banden (30-37 kDa) auf Dimerisierung hin.

Durch die Auftrennung der verschiedenen BioY-Proteine in der Größenausschluss-Chromatografie konnte bestätigt werden, dass sie neben dem Monomer auch oligomere Zustände ausbildeten. Alle zwölf Proteine zeigten ein ähnliches Elutionsprofil mit zwei meist klar definierten Peaks, wie in Abbildung 9 zu sehen ist. Die Proteine eluierten nach Zugabe von 8 bis 17 ml Elutionspuffer als ein schneller laufendes, vermutliches Dimer und ein langsamer wanderndes Monomer. Aufgrund unterschiedlicher Proteinausbeuten bei der affinitätschromatografischen Reinigung ($RcBioY = LlBioY1 = LlBioY2 = SpBioY2 = ObBioY1 = ObBioY2 = RpBioY > SmBioY = RdBioY = BjBioY \gg AtBioY > SpBioY1$) wurden die Ordinaten der Chromatogramme in Abbildung 9 uneinheitlich skaliert.

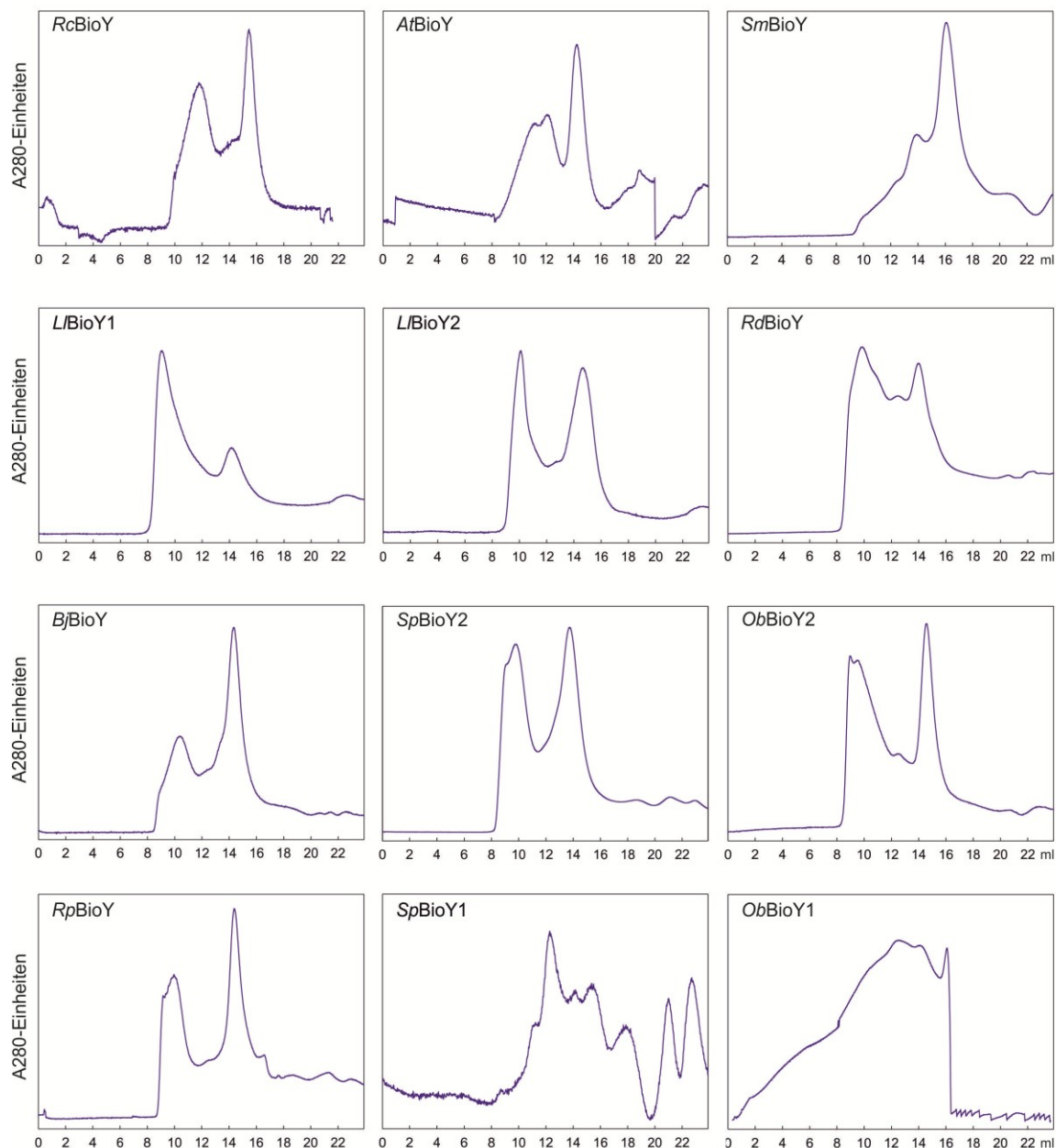


Abbildung 9: Oligomerzustände aller untersuchten BioY-Proteine in Detergenzlösung. Aus sechs Litern Zellsuspension gewonnene Solubilisate wurden an der Ni^{2+} -NTA-Matrix chromatografiert und die Eluate wurden über Größenausschluss-Chromatografie bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm (A280) analysiert. Die Ordinaten der verschiedenen Chromatogramme wurden uneinheitlich in arbiträren A280-Einheiten skaliert. Alle BioY-Proteine eluierten in mindestens zwei Peaks, wobei die schneller laufenden Peaks bei 8-12 ml das Dimer und mögliche höhere Oligomerzustände enthielten, während das Monomer im langsamer laufenden Peak bei 13-17 ml eluierte.

Eine nähere Untersuchung der durch Größenausschluss-Chromatografie voneinander getrennten Monomer- und Dimer-Fractionen gab Hinweise darauf, dass die Oligomerzustände nicht stabil waren. Dies ist in Abbildung 10 am Beispiel von *ObBioY2* dargestellt. Die Elutionsfraktionen von 13-17 ml der monomeren Fraktion wurden vereinigt und nach sechs

Tagen Inkubation auf Eis erneut chromatografiert. Es zeigte sich zusätzlich zum erwarteten Monomerpeak bei 13-17 ml ein starker Dimerpeak bei 8-10 ml. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass innerhalb der abgetrennten monomeren Fraktion auch dimeres BioY enthalten war, aber da der Dimeranteil in Abbildung 10 B fast ein Drittel des Monomeranteils betrug, stellte die Oligomerisierung von monomerem *ObBioY2* zum Dimer die wahrscheinlichere Erklärung dar.

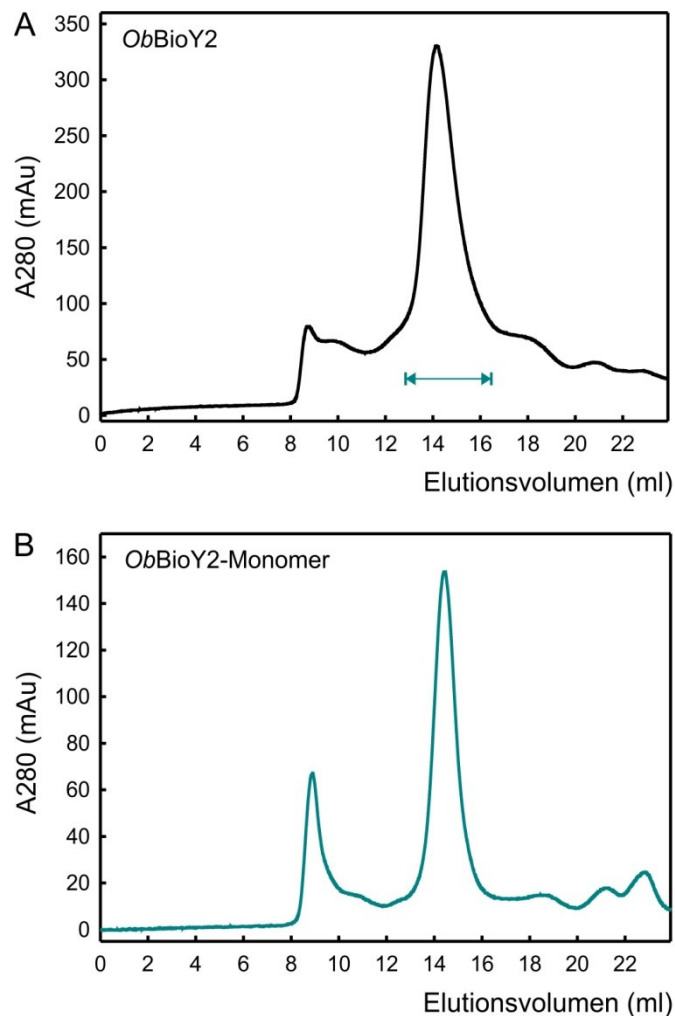


Abbildung 10: Oligomerisierung von monomerem *ObBioY2* nach Größenausschluss-Chromatografie. (A) *ObBioY2* wurde über Größenausschluss-Chromatografie in Dimer und Monomer aufgetrennt. Die monomere Fraktion (blau) wurde nach sechstägiger Inkubation auf Eis erneut chromatografiert (B) und zeigte ebenfalls einen schneller laufenden Dimerpeak. Die Detektion der Proteine erfolgte über die Absorption bei 280 nm.

2.1.2 Einfluss des Substrats auf die Oligomerisierung

Alle untersuchten BioY-Proteine lagen *in vitro* sowohl als Monomer als auch als Dimer vor. Da die bisher beschriebenen Untersuchungen mit isoliertem Protein aus Zellen durchgeführt wurden, welche in Anwesenheit von Biotin in Vollmedium kultiviert worden waren, stellte

sich die Frage, ob das Substrat einen Einfluss auf die Stöchiometrie der S-Einheiten hatte. Daher wurde *RcBioY* zum Vergleich aus in biotinfreiem Minimalmedium angezogenen Zellen isoliert. Der Gehalt an fest gebundenem Biotin wurde mit Hilfe von „*high-performance*“-Flüssigkeitschromatografie (HPLC) und darauf folgender „*electrospray ionization time-of-flight*“-Massenspektrometrie (ESI-TOF-MS) quantifiziert. *RcBioY* aus in Vollmedium angezogenen Zellen enthielt $0,43 \pm 0,06$ mol Biotin pro mol BioY (Abbildung 15, siehe Seite 34), während in *RcBioY* aus Zellen, die in Minimalmedium kultiviert worden waren, kein Biotin nachweisbar war.

Der Einfluss des Substrats auf die Stöchiometrie von *RcBioY* wurde bei *in vitro*-Zugabe von Biotin deutlich. Das biotinfrei isolierte BioY wurde in vier Portionen zu je 144 μg aufgeteilt, was einer Stoffmenge von 6,56 nmol BioY entsprach. Die Proben wurden mit 0 nmol; 0,85 nmol; 6,88 nmol bzw. 61,6 nmol Biotin versetzt, wodurch die molaren Verhältnisse von 0:1; 0,13:1; 1,05:1 bzw. 9,4:1 (Biotin:BioY) erreicht wurden, welche im Folgenden zur Vereinfachung jedoch gerundet als 0:1; 0,1:1; 1:1 bzw. 10:1 bezeichnet werden. Nach Inkubation der mit Biotin versetzten Proben auf Eis für 24 Stunden wurden diese mittels Größenausschluss-Chromatografie analysiert; das Ergebnis ist in Abbildung 11 zu sehen.

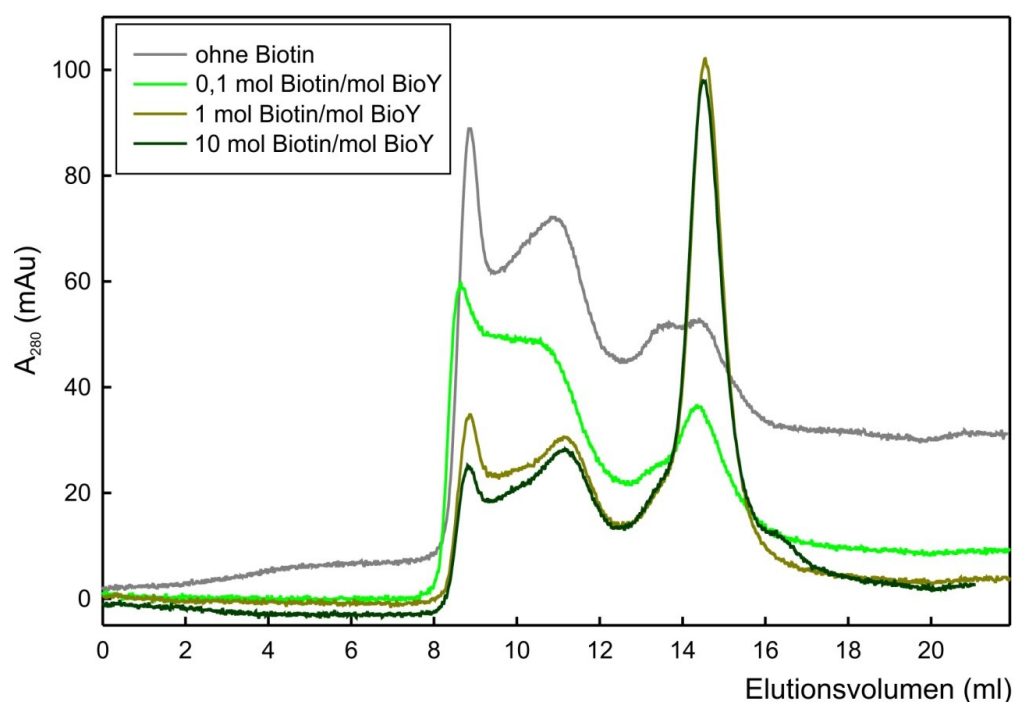


Abbildung 11: Beeinflussung der BioY-Stöchiometrie durch das Substrat Biotin. Zu 6,56 nmol biotinfreiem *RcBioY* wurde in vier parallelen Ansätzen kein (grau), 0,85 nmol (hellgrün), 6,88 nmol (olive) bzw. 61,6 nmol (dunkelgrün) Biotin gegeben und die Ansätze wurden 24 Stunden auf Eis inkubiert. Die Oligomere wurden über Größenausschluss-Chromatografie voneinander getrennt. Monomeres BioY eluierte bei 13-16 ml, die oligomeren Formen zwischen 8 und 12 ml.

Ohne Biotin lag BioY in marginalen Mengen als Monomer vor, während der Hauptanteil des Proteins in den zwei eng beieinander laufenden, oligomeren Formen zu finden war. Inwieweit der erste oder der zweite Peak das Dimer darstellte und ob der jeweils andere Peak eine mögliche Zwischenstufe oder ein höheres Oligomer enthielt, blieb unklar.

Die Zugabe von geringen Biotinkonzentrationen in einem molaren 0,1:1-Verhältnis von Biotin zu BioY zeigte noch keinen Einfluss des Substrats auf die Oligomerzustände. Deutlich ist aber zu erkennen, dass ab einem äquimolaren Verhältnis (1:1) eine Zunahme des Monomers bei gleichzeitiger Abnahme der oligomeren Formen erfolgte. Die Zugabe von Biotin im Verhältnis 10:1 bewirkte keine weitere Veränderung. Für die Quantifizierung des Gehalts an gebundenem Biotin wurden jeweils die aufgefangenen Elutionsfraktionen von 8-12 ml vereinigt; diese Probe stellte den Oligomerzustand dar. Bei einer getrennten Analyse beider Peaks wären entweder die Nachweisgrenzen der Quantifizierungsmethoden unterschritten worden oder das Probenvolumen hätte nur für die Quantifizierung von Proteingehalt oder Biotingehalt ausgereicht.

Die vereinigten Fraktionen von 13-16 ml enthielten das Monomer. Die Proteinmengen und der jeweilige Biotingehalt wurden quantifiziert; beides ist in Tabelle 1 jeweils für die vier verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Es zeigte sich, dass (i) noch etwa 2,7 bis 3,22 nmol BioY-Protein in den jeweils gesammelten Fraktionen enthalten war, während der Rest wahrscheinlich als degradiertes Protein in den Fraktionen 16-22 ml oder in anderen nicht aufgefangenen Fraktionen eluierte. Es wurde beobachtet, dass (ii) nur ein geringer Anteil des Biotins gebunden wurde, was besonders bei einem Biotinüberschuss von 10:1 zu erwarten war. Es zeigte sich, dass (iii) die Oligomerfraktion in allen vier Proben biotinfrei vorlag und dass sich (iv) die Beladung des Monomers *in vitro* einer Stöchiometrie von 1:1 annäherte, sofern Biotin in äquimolaren Konzentrationen oder im Überschuss (10:1) zugegeben wurde. Die quantifizierten Mengen an gebundenem Biotin an BioY betrugen dann 0,7:1 bzw. 0,9:1. Bei Zugabe von Biotin im Verhältnis 0,1:1 war in der Monomerfraktion mit 0,31:1 Biotin pro BioY mehr Biotin gebunden als theoretisch erwartet worden war. Da nur insgesamt 2,76 nmol BioY in den beiden untersuchten Fraktionen aufgefangen wurden, kann vermutet werden, dass die übrigen 3,8 nmol BioY als degradiertes Protein vorlagen und nicht zur Biotinbindung zur Verfügung standen. Dadurch betrug das eingesetzte Verhältnis nicht 0,1:1, sondern 0,31:1 nmol Biotin:BioY. Dennoch wurde das Biotin nicht vollständig gebunden, da nur in der Monomerfraktion etwa jedes vierte BioY-Molekül mit Biotin besetzt war, während das Dimer biotinfrei vorlag. Alle gezeigten Daten wurden in einer Wiederholungsmessung bestätigt.

Tabelle 1: Biotin- und BioY-Mengen in den Oligomerpeaks der vier untersuchten Proben

Verhältnis Biotin:BioY	0		0,1:1		1:1		10:1	
Oligomerfraktion (8-12 ml) Monomerfraktion (13-16 ml)	Dimer	Monomer	Dimer	Monomer	Dimer	Monomer	Dimer	Monomer
quantifiziertes Biotin [nmol]	0	0	0	0,27	0	1,18	0	1,51
quantifiziertes BioY [nmol]	2,0	0,69	1,9	0,86	1,55	1,67	1,47	1,65
Verhältnis gebundenes Biotin zu BioY	0	0	0	0,31:1	0	0,7:1	0	0,9:1

Ab einer äquimolaren Zugabe von Biotin war *in vitro* eine maximale Beladung von BioY von annähernd 1:1 möglich und die Bindung von Biotin erfolgte durch das Monomer.

2.1.3 Die Substratbindestelle von BioY

Die S-Einheiten RibU oder ThiT binden das Substrat ebenso als Monomer, wie dies für *RcBioY in vitro* nachgewiesen werden konnte (Duurkens *et al.* 2007, Erkens & Slotboom 2010). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren die Kristallstrukturen inklusive der Substratbindestellen von RibU aus *Staphylococcus aureus* und ThiT aus *L. lactis* bekannt (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011). Die trotz geringer Sequenzähnlichkeiten sehr ähnliche Topologie der S-Einheiten untereinander deutete darauf hin, dass die Substratbindestellen auch bei anderen S-Einheiten im Bereich zwischen Transmembranhelices 4 bis 6 zu finden sind. Zur Identifizierung der potentiellen Aminosäurereste, die an der Bindung von Biotin in BioY beteiligt sein könnten, wurden 182 in der SEED-Datenbank enthaltene BioY-Proteine auf Sequenzebene untersucht. Ein Auszug mit 70 verglichenen BioY-Proteinsequenzen ist im Anhang in Abbildung 49 zu finden. Die stark konservierten Aminosäuren (>75 %) sind im BioY-Topologiemodell in Abbildung 12 hervorgehoben.

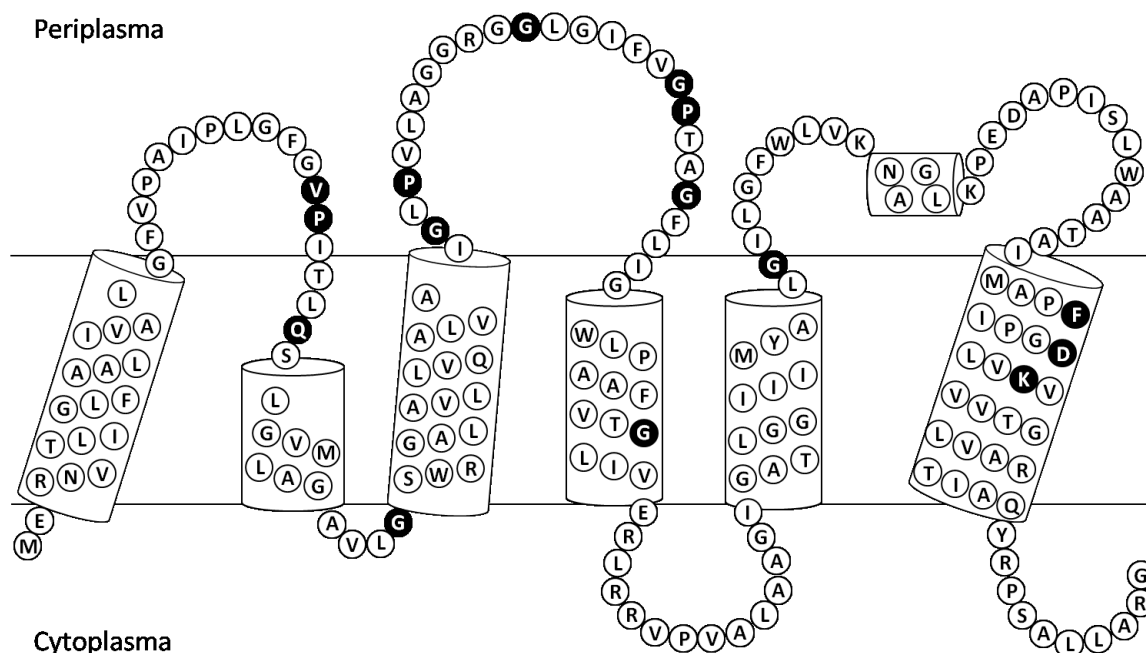


Abbildung 12: Topologiemodell von RcBioY. Die potentielle Sekundärstruktur basierte auf einem mit dem SWISS-MODEL-Server erstellten 3D-Modell. Stark konservierte Aminosäuren (>75 %) in 182 Mitgliedern der BioY-Proteinfamilie sind schwarz hervorgehoben.

Neben einigen konservierten Prolin- und Glycinresten, die vermutlich eher für die Struktur des Proteins wichtig sind, wurde in Helix 6 das stark konservierte Motiv F₁₆₀XXXD₁₆₄XXK₁₆₇ (X für eine beliebige Aminosäure) identifiziert. Die für Aspartat und Lysin codierenden Gene wurden mutiert. Aspartat wurde durch Asparagin und Lysin entweder durch ebenfalls positiv geladenes Arginin oder durch neutrales Glutamin ersetzt. Auf die Konstruktion einer ladungsneutralen D164E-Mutante wurde verzichtet, da Glutamat auch natürlicherweise in manchen BioY-Proteinen vorkommt. In Abbildung 13 ist das Ergebnis der Untersuchung der veränderten RcBioY-Varianten dargestellt. Die Aminosäureaustausche hatten keinen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität, da alle drei veränderten BioY-Varianten wie der Wildtyp mittels Affinitätschromatografie über den N-terminalen His-tag gereinigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert werden konnten. Es zeigte sich, dass keines der drei veränderten Proteine funktionell war. Sie waren nicht in der Lage, die Akkumulation radioaktiv markierten Biotins in lebenden Zellen zu vermitteln (Abbildung 13 B) und es konnte in mehrfachen Wiederholungsmessungen kein gebundenes Biotin quantifiziert werden. Die Aspartat- und Lysinreste waren essentiell für die Bindung von Biotin. Die Kristallstruktur von BioY aus *L. lactis*, welche einige Zeit nach Durchführung dieser Mutageneseexperimente gelöst wurde, bestätigte, dass die Aspartat- und Lysinreste des identifizierten konservierten Motivs in Helix 6 direkt mit dem Ureidoring des Biotins interagieren (Berntsson *et al.* 2012).

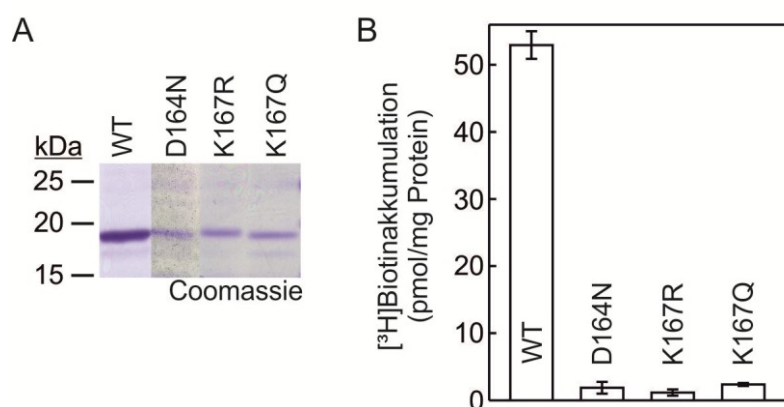


Abbildung 13: Eigenschaften der RcBioY-Varianten. (A) Wildtypisches RcBioY und RcBioY-Proteine mit den Aminosäureaustauschen D164N, K167R und K167Q wurden mittels Affinitätschromatografie gereinigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert. (B) Die *E. coli*-Stämme mit den verschiedenen BioY-Varianten wurden in Minimalmedium mit 4 nM [^3H]Biotin inkubiert. Aliquots wurden gefiltert und anschließend wurde die filtergebundene Radioaktivität bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Wiederholungsmessungen mit daraus resultierender Standardabweichung.

2.1.4 Herstellung eines künstlichen RcBioY-Dimers

Obwohl BioY im monomeren Zustand offensichtlich zur Bindung von Biotin in der Lage war, war damit nicht ausgeschlossen, dass die bei allen untersuchten BioY-Proteinen beobachtete Dimerisierung für die Transporterfunktion nötig war. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurde ein kovalent verknüpftes BioY-Dimer hergestellt, indem zwei *bioY*-Gene in Kopf-Schwanz-Richtung und getrennt durch sechs Nukleotide miteinander verknüpft wurden. Diese Fusion wurde mit dem Gedankengang hergestellt, dass im Falle einer funktionellen Interaktion der beiden Domänen des Dimers bei inaktivierenden Aminosäureaustauschen in nur einer der Domänen die Aktivität des Dimers möglicherweise stark beeinträchtigt ist oder verloren geht. Das resultierende Protein BioY_{WT}-Y_{WT} trug N-terminal einen 10-fach His-tag und C-terminal einen FLAG-tag. Die Expression der Tandem-Genfusion führte in *E. coli* zu einem stabilen, durch Proteolyse nicht in die monomere Form abbaubaren BioY_{WT}-Y_{WT}-Dimer mit einer apparenten molekularen Masse von etwa 35 kDa (Abbildung 14 A), die – wie bei Membranproteinen üblich – etwas geringer als die tatsächliche Masse von 41,5 kDa war. Die reproduzierbaren Abbaubanden sowohl bei BioY_{WT} als auch bei BioY_{WT}-Y_{WT} resultierten aus leichtem, proteolytischem Abbau des N-terminalen His-tags.

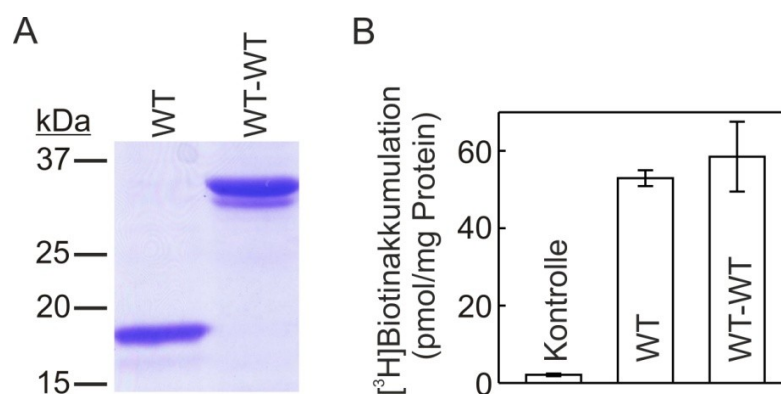


Abbildung 14: Eigenschaften des künstlich fusionierten BioY_{WT}-Y_{WT}-Dimers. (A) BioY_{WT} und BioY_{WT}-Y_{WT} wurden rekombinant in *E. coli* produziert und affinitätschromatografisch gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert. (B) Die Akkumulation radioaktiv markierten Biotins wurde in den BioY_{WT}- oder BioY_{WT}-Y_{WT}-produzierenden *E. coli*-Zellen gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen mit einem leeren Vektor. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit daraus resultierender Standardabweichung.

Das kovalent verknüpfte Dimer war funktionell, denn es bewirkte im gleichen Maße wie BioY_{WT} die Akkumulation von Biotin in den Zellen (Abbildung 14 B). Für die Quantifizierung des Biotingehalts von gereinigtem BioY_{WT} sowie BioY_{WT}-Y_{WT} wurden die Proteine aus in Vollmedium kultivierten Zellen gereinigt. Die Ergebnisse der Biotin-Quantifizierungen von acht bzw. sieben biologischen Replikaten sind in Abbildung 15 dargestellt. BioY_{WT} sowie BioY_{WT}-Y_{WT} enthielten im gereinigten Zustand fest gebundenes Biotin. Der Besetzungsgrad war im Falle des kovalent verknüpften Dimeres mit $0,23 \pm 0,06$ (mol Biotin pro mol BioY-Domäne) etwa um den Faktor zwei geringer als im Falle des monomeren BioY_{WT} mit $0,43 \pm 0,06$. Dies entsprach einer Bindung von einem Biotinmolekül pro zwei BioY-Domänen im Falle von BioY_{WT} und vier BioY-Domänen im Falle von BioY_{WT}-Y_{WT}. Die beobachteten Stöchiometrien von 1:2 bzw. 1:4 (Biotin pro BioY-Domäne) deuteten auf eine funktionelle Interaktion der BioY-Proteine bzw. BioY-Domänen *in vivo* hin.

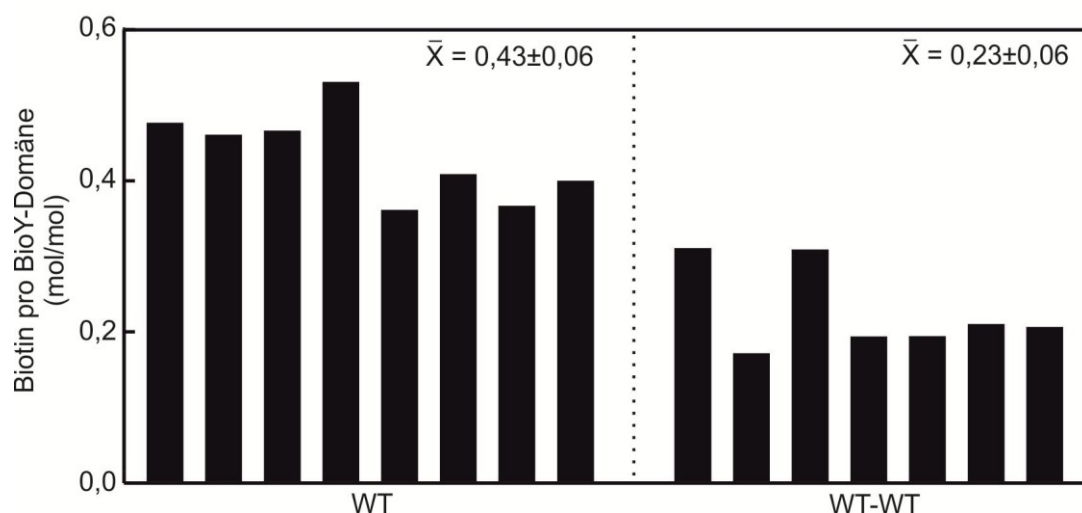


Abbildung 15: Quantifizierung des an BioY_{WT} und BioY_{WT}-Y_{WT} gebundenen Biotins. Mittels Affinitätschromatografie gereinigtes BioY_{WT} (WT) bzw. BioY_{WT}-Y_{WT} (WT-WT) wurde denaturiert, pelletiert und das zuvor an die Proteine gebundene Biotin wurde massenspektrometrisch analysiert. Biotin wurde bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge quantifiziert und pro BioY-Domäne in mol Biotin/mol Protein aufgetragen. Die Mittelwerte (\bar{X}) der unabhängigen Messungen und daraus resultierende Standardabweichungen sind angegeben.

Während *in vitro* durch Zugabe von Biotin im Überschuss circa eine 1:1-Stöchiometrie erreicht werden konnte, erhöhte sich in lebenden Zellen der Besetzungsgrad von BioY_{WT} bzw. von BioY_{WT}-Y_{WT} auch durch Zugabe von 1 μ M Biotin zum Vollmedium nur marginal auf 0,7:1 (BioY_{WT}) bzw. 0,5:1 (BioY_{WT}-Y_{WT}) und erreichte nicht das Verhältnis von einem Molekül Biotin pro einer BioY-Domäne.

2.1.5 Eigenschaften der BioY-Y-Dimere mit Aminosäureaustauschen

Zum Nachweis der funktionellen Interaktion der BioY-Domänen wurden für die folgenden Experimente Tandem-Dimer-Varianten mit inaktivierter N-terminaler bzw. C-terminaler Domäne oder zwei nicht funktionellen Domänen erzeugt. Die Inaktivierung erfolgte durch die Aminosäureaustausche D164N, K167R oder K167Q in den jeweiligen Domänen. Die resultierenden Proteine mit Veränderungen in der N-terminalen Domäne werden als BioY_{D164N}-Y_{WT}, BioY_{K167R}-Y_{WT} bzw. BioY_{K167Q}-Y_{WT} bezeichnet. Entsprechend tragen die Proteine BioY_{WT}-Y_{D164N}, BioY_{WT}-Y_{K167R} sowie BioY_{WT}-Y_{K167Q} Veränderungen in der Substratbindestelle der C-terminalen Domäne und die Proteine BioY_{D164N}-Y_{D164N}, BioY_{K167R}-Y_{K167R} bzw. BioY_{K167Q}-Y_{K167Q} in beiden Domänen. Alle Proteine wurden stabil in *E. coli* produziert, wie die in Abbildung 16 dargestellte immunologische Detektion über den Antikörper gegen den C-terminalen FLAG-tag nach Auftrennung der Membranfraktion mittels

SDS-PAGE zeigte. BioY_{D164N}-Y_{WT} wies als einzige Variante leichten proteolytischen Abbau auf, der der molekularen Masse des Monomers entsprach.

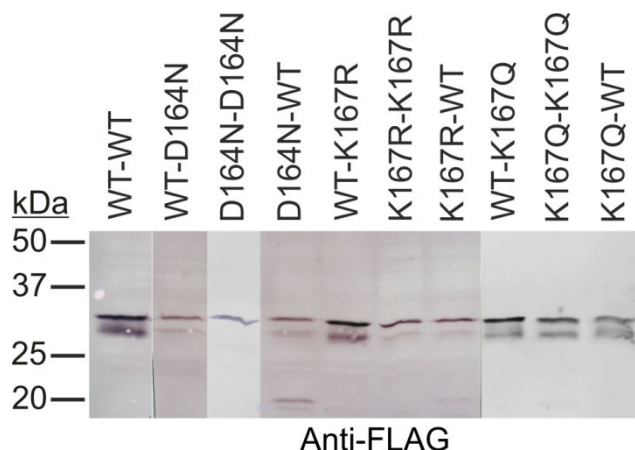


Abbildung 16: Stabilität der verschiedenen BioY-Y-Varianten. In rekombinanten *E. coli*-Zellen wurde die Expression der jeweiligen Tandemfusionen in LB-Medium bei einer OD₅₇₈ von 0,1 durch Zugabe von 1 mM IPTG für vier Stunden induziert. Die Zellen wurden pelletiert, gewaschen und auf eine finale OD₅₇₈ von 6 eingestellt. Nach Zugabe von Probenpuffer und Erhitzen bei 95 °C für 10 Minuten mit anschließender Zentrifugation wurden 30 µg Gesamtprotein pro Probe mittels SDS-Page aufgetrennt. Nach Immunoblot mit Antikörpern gegen den C-terminalen FLAG-tag konnten alle im Text beschriebenen BioY-Y-Varianten mit einer Masse von etwa 35 kDa detektiert werden, die dem Dimer entspricht. Ausschließlich BioY_{D164N}-Y_{WT} zeigte ein Abbauprodukt mit der ungefähren Masse des Monomers.

Im Folgenden wurde analysiert, in welchem Umfang Tandem-Dimere mit Aminosäureaustauschen in der vorderen, der hinteren oder in beiden Domänen (i) Biotinakkumulation in *E. coli*-Zellen vermittelten und (ii) nach der Reinigung mit Biotin beladen waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellt und für beide Untersuchungen diente das wildtypische Dimer als Kontrolle.

Erwartungsgemäß führte der gleichzeitige Austausch von Asparagin 164 oder Lysin 167 in der vorderen und hinteren Domäne zu inaktiven BioY-Y-Varianten, die nicht zur Biotinakkumulation beitrugen und als substratfreie Proteine gereinigt wurden.

Der Austausch von Asp164 und Lys167 in nur einer der Domänen des fusionierten Dimers führte zu funktionellen Proteinen, welche die Akkumulation von [³H]Biotin in den Zellen vermitteln konnten, wie in Abbildung 17 zu sehen ist. Varianten mit den Austauschen D164N und K167R zeigten dabei nur etwa 25 % der Aktivität des BioY_{WT}-Y_{WT}, während Varianten mit dem K167Q-Austausch etwa 75 % der Aktivität des fusionierten Wildtypdimers vermittelten. Bei einer autonomen Transporterfunktion der BioY-Domänen hätte die Inaktivierung einer Domäne eine Reduzierung der Aktivität auf 50 % zur Folge gehabt. Die ermittelten Aktivitäten unterschieden sich jedoch signifikant von einer Aktivität von 50 % und zeigten so die funktionelle Interaktion der BioY-Domänen.

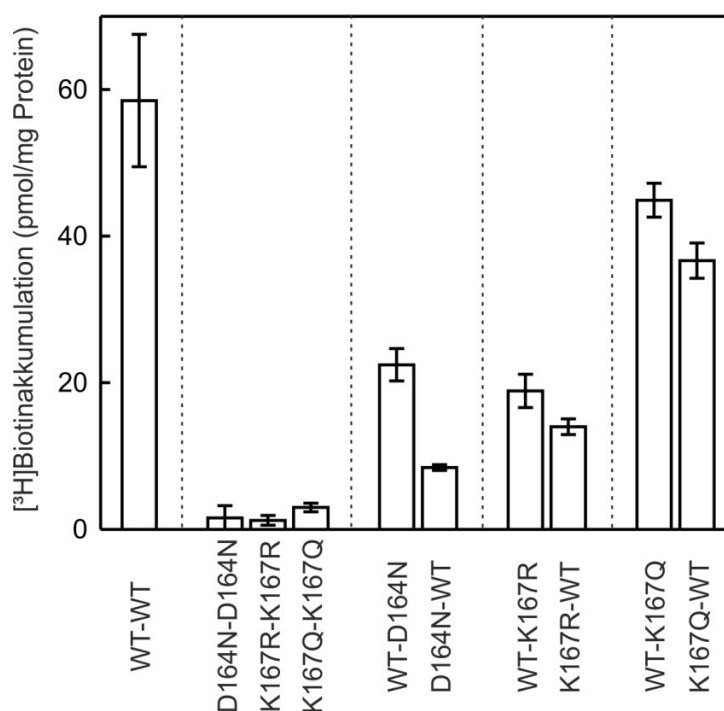


Abbildung 17: Biotinakkumulation vermittelt durch verschiedene BioY-Y-Varianten. Rekombinante *E. coli*-Zellen produzierten die im Text beschriebenen BioY-Y-Varianten mit Einzel- oder Doppelaustauschen von D164N, K167R bzw. K167Q. Die Akkumulation radioaktiv markierten Biotins in den Zellen wurde untersucht. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Wiederholungsmessungen mit daraus resultierender Standardabweichung.

Die Inaktivierung der N-terminalen Domäne reduzierte die Akkumulation radioaktiv markierten Biotins in den Zellen stärker als die Inaktivierung der C-terminalen Domäne. Dies deutet darauf hin, dass die C-terminale Domäne der Tandem-Dimere etwas weniger aktiv ist als die N-terminale Domäne. Da die Domänen der Tandem-Dimere über einen relativ kurzen Linker von nur zwei Aminosäuren miteinander fusioniert waren, könnten daraus sterische Behinderungen besonders der ersten Transmembranhelix der C-terminalen Domäne resultieren, welche die Aktivität reduzierten.

Unabhängig davon, ob die Biotinbindestelle in der N-terminalen oder C-terminalen Domäne verändert wurde, konnten die Proteine mit gebundenem Substrat gereinigt werden. Alle Dimer-Varianten mit einer inaktivierten Domäne hatten die gleiche Menge an Biotin pro BioY-Domäne gebunden wie das künstlich fusionierte Wildtyp-Dimer (Abbildung 18).

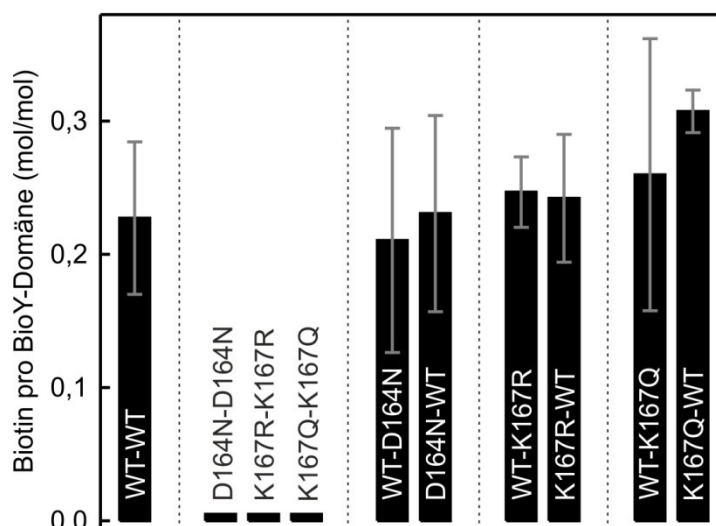


Abbildung 18: Quantifizierte Biotinmengen, gebunden an verschiedene BioY-Y-Varianten. Rekombinante *E. coli*-Zellen produzierten in Vollmedium die im Text beschriebenen BioY-Y-Varianten mit Einzel- oder Doppelaustauschen von D164N, K167R bzw. K167Q. Die Proteine wurden gereinigt und die Menge an gebundenem Biotin pro BioY-Domäne wurde quantifiziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehrfachen (zwischen zwei und acht) unabhängigen Messungen mit daraus resultierender Standardabweichung.

Mit einer inaktivierten Domäne könnten die Dimer-Varianten bei vollständiger Beladung maximal eine Stöchiometrie von 1:2 aufweisen (Biotin pro BioY-Domäne). Die beobachtete Stöchiometrie von 1:4 ist nicht mit einem Modell vereinbar, bei welchem die Domänen unabhängig voneinander funktionieren. Die Daten deuteten vielmehr auf ein Modell hin, bei dem die BioY-Domänen zweier Dimere *in vivo* funktionell miteinander interagieren und welches in der Diskussion ausführlich besprochen wird.

2.1.6 Oligomerisierung von *RcBioY-Y in vivo*

Die vorliegenden Ergebnisse zum Substratbeladungszustand von BioY und BioY-Y standen im Einklang mit einer Hypothese, nach der *in vivo* zwei BioY-Domänen miteinander interagieren, welche im Falle des kovalent verknüpften Dimers von zwei verschiedenen Polypeptidketten stammen können. Der Nachweis der Interaktion fluorophormarkierter BioY-Monomere wurde in vorangegangenen Hetero-FRET-Experimenten erbracht (Finkenwirth *et al.* 2010). Zur Untersuchung der Frage, ob auch das BioY-Y-Dimer in lebenden Zellen oligomerisiert, wurde ebenfalls ein FRET-Verfahren genutzt. In den vorangegangenen Hetero-FRET-Messungen wurden zwei Varianten des zu analysierende BioY produziert, wobei die erste mit einem Donorfluorophor und die zweite mit einem Akzeptorfluorophor fusioniert war. Im Gegensatz dazu kam jetzt ein Homo-FRET-Verfahren zum Einsatz, bei dem der Energietransfer zwischen

nah benachbarten, identischen Fluorophoren erfolgt. Die Energieübertragung bei Homo-FRET ändert im Gegensatz zu Hetero-FRET weder die Fluoreszenzintensität noch die -lebenszeit, aber sie verändert die Polarisierung der Fluoreszenzemission. Polarisiertes Anregungslicht führte zu paralleler und dazu senkrechter Polarisierung der Fluoreszenzemission. Daraus berechnet sich die Fluoreszenz-Anisotropie, die durch Auftreten von Homo-FRET und somit Depolarisierung der Fluoreszenz reduziert wird (Bader *et al.* 2011). Als Fluorophor wurde das monomere gelb-fluoreszierende Protein (mYFP) genutzt und N-terminal an BioY_{WT} bzw. BioY_{WT}-Y_{WT} fusioniert. Die Proteine wurden in *E. coli*-Zellen produziert und die Fluoreszenz-Anisotropie wurde in Zusammenarbeit mit Joanna Ziolkowska und Prof. Dr. Andreas Herrmann aus der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik der Humboldt-Universität zu Berlin spektrometrisch in lebenden Zellen gemessen.

Als Referenzwert für die folgenden Experimente, deren Ergebnisse in Abbildung 19 dargestellt sind, wurde der Fluoreszenz-Anisotropiewert für mYFP-BioY_{WT} genutzt. Die schon durch die vorangegangenen Hetero-FRET-Messungen bestätigte Oligomerisierung von getaggttem BioY_{WT} führte zur Interaktion der mYFP-tags und damit zu Homo-FRET, wodurch die Fluoreszenz-Anisotropie stark reduziert wurde (0,2115). Es wurde angenommen, dass bei Vorhandensein größerer Anteile an ungetaggtten BioY_{WT}-Domänen die Homo-FRET-Ereignisse seltener auftreten würden, wodurch sich die Fluoreszenz-Anisotropie erhöhen würde. Dies konnte durch die parallele Produktion von getaggttem und ungetaggttem BioY_{WT} (mYFP-BioY_{WT} + BioY_{WT}) bestätigt werden. Abgesehen von der Interaktion von getaggtten Monomeren miteinander interagierten auch getaggte mit ungetaggtten Monomeren. Dies reduzierte die Homo-FRET-Ereignisse und die Fluoreszenz-Anisotropie erhöhte sich auf 0,2315.

Es wurde weiterhin angenommen, dass die Oligomerisierung von mYFP-BioY_{WT}-Y_{WT} ebenfalls zur Reduzierung der Homo-FRET-Ereignisse und somit – verglichen mit mYFP-BioY_{WT} – zur Erhöhung der Fluoreszenz-Anisotropie führen müsste. Neben der Interaktion getaggtter BioY-Domänen untereinander würden auch Interaktionen zwischen getaggtten und ungetaggtten Domänen auftreten sowie die nicht detektierbare Interaktion von ungetaggtten Domänen untereinander. Die Reduzierung der Homo-FRET-Ereignisse durch die zusätzlichen Interaktionen von mYFP-BioY-Domänen mit ungetaggtten BioY-Domänen konnte experimentell durch eine erhöhte Fluoreszenz-Anisotropie bestätigt werden (0,2324). Homo-FRET-Ereignisse sanken noch weiter bei Zellen, welche getaggttes und ungetaggttes Dimer (mYFP-BioY_{WT}-Y_{WT} + BioY_{WT}-Y_{WT}) koproduzierten, da hier die Wahrscheinlichkeit für die Interaktion getaggtter Domänen weiter sank. Die theoretische Annahme konnte durch die gemessene, im Vergleich zum Referenzwert von mYFP-BioY_{WT} stark erhöhte Fluoreszenz-

Anisotropie (0,2524) bestätigt werden. Durch die Experimente konnte deutlich gezeigt werden, dass die Interaktion ungetaggtter Domänen mit getaggtten Domänen die Homo-FRET-Ereignisse reduzierte und somit die Fluoreszenz-Anisotropie erhöhte. Die Daten deuten auf eine Oligomerisierung der kovalent verknüpften Dimere *in vivo* hin.

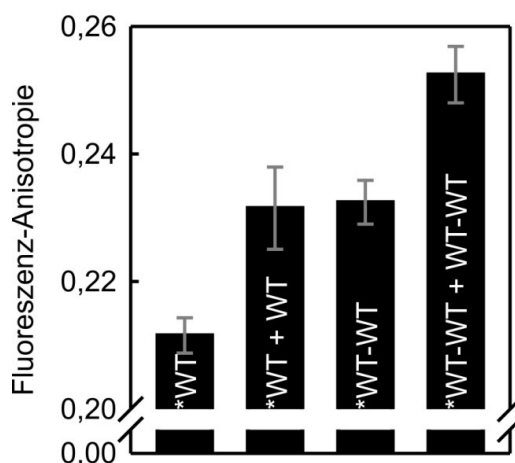


Abbildung 19: Fluoreszenz-Anisotropie von mYFP-BioY_{WT}-Varianten. Rekombinante *E. coli*-Zellen produzierten die mYFP (*) getaggtten Varianten mYFP-BioY_{WT} (*WT) und mYFP-BioY_{WT}-Y_{WT} (*WT-WT) oder koproduzierten zusätzlich ungetaggttes BioY_{WT} (WT) oder BioY_{WT}-Y_{WT} (WT-WT). Die spektrometrische Analyse wurde in dreifacher Wiederholung mit gewaschenen Zellen mit einer OD₅₇₈ von 1 durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus Messungen dreier biologischer Replikate mit daraus resultierender Standardabweichung.

2.2 Einige BioY-Proteine besitzen Transporter-Funktion

In früheren Untersuchungen wurde für RcBioY in Abwesenheit des zugehörigen ECF-Moduls die Akkumulation radioaktiv markierten Biotins durch *E. coli*-Zellen beobachtet und als Transport in die Zellen interpretiert (Hebbeln *et al.* 2007). Ebenso wurde die beobachtete Biotinakkumulation in Zellen, welche ein BioY-Protein aus *Chlamydia* spp. rekombinant produzierten, als Biotintransport interpretiert. Bei dem untersuchten BioY handelte es sich um ein Protein, welches ohne erkennbare T-Einheit im Organismus codiert ist (Fisher *et al.* 2012). Da BioY ein kleines Protein ist und keinen Kanal für den Substratdurchtritt besitzt (Berntsson *et al.* 2012, Majsnerowska *et al.* 2013), stellte der Nachweis der Dimerisierung verschiedener BioY-Proteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen ersten Hinweis dafür dar, dass die als Biotintransport interpretierte Funktion von BioY durch die Interaktion zweier BioY-Proteine erfolgen kann. Es stellte sich jedoch die Frage, ob die beobachtete Akkumulation radioaktiv markierten Biotins durch die Zellen tatsächlich Transport oder nur Bindung an der Oberfläche

darstellte, nachdem *in vitro*-Untersuchungen der Biotintransportkapazität von in Proteoliposomen eingebautem *RcBioY* bzw. *L/BioY1* Zweifel an der Transportfähigkeit der BioY-Proteine ohne AAT-Modul aufkommen ließen (Berntsson *et al.* 2012). Es wurde weder Biotinakkumulation durch die Proteoliposomen noch ein Austausch zwischen dem Biotin im Lumen der Proteoliposomen und dem Biotin außerhalb der Proteoliposomen beobachtet. Die Autoren schlussfolgerten, dass das ausschließlich an das BioY-Protein gebundene, radioaktiv markierte Biotin durch langsame *Off*-Kinetiken im Minutenbereich und durch schnelle *On*-Kinetiken in Sekundenbruchteilen durch unmarkiertes Biotin ersetzt wurde. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass im *in vitro*-System sowohl *RcBioY* als auch *L/BioY* Biotin mit hoher Affinität binden, aber nicht über die Liposomenhülle transportieren konnten (Berntsson *et al.* 2012).

Von diesen *in vitro*-Experimenten konnte nur ungenügend auf die *in vivo*-Funktion von BioY geschlossen werden. Um *in vivo* zwischen Biotinbindung und Biotintransport unterscheiden zu können, wurde in einem ersten Experiment die zellassozierte Radioaktivität nach Inkubation mit [³H]Biotin und anschließender Zugabe von unmarkiertem Biotin im Überschuss bestimmt. Die Zellen wurden mit 4 nM Biotin für 3,5 Stunden vorinkubiert, die Menge an zellassoziierter Radioaktivität wurde gemessen und anschließend wurde ohne Waschen der Zellen unmarkiertes Biotin im 100-fachen Überschuss (400 nM) zugegeben. Die zellassozierte Radioaktivität wurde nach 1-, 5-, 10-, 15-, 20- bzw. 60-minütiger Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

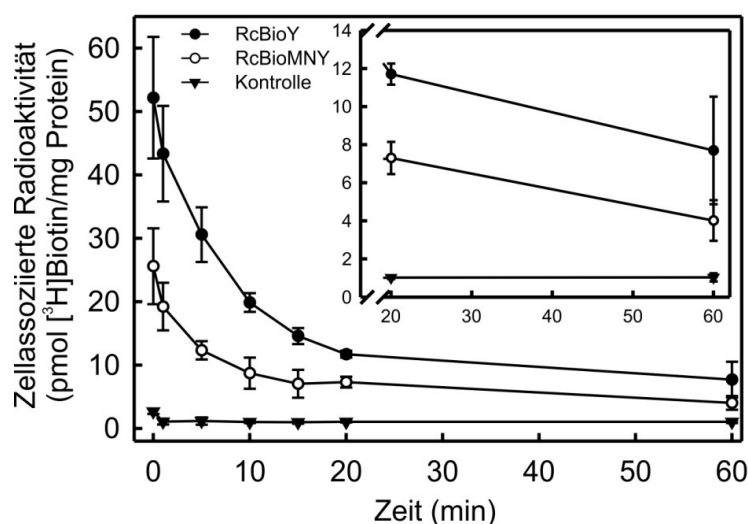


Abbildung 20: Zellossoziierte Radioaktivität an *RcBioY* oder *RcBioMNY*-produzierenden Zellen. *E. coli*-Zellen, welche entweder *RcBioY* (schwarze Kreise) oder *RcBioMNY* (weiße Kreise) produzierten oder einen Kontrollvektor ohne für ein BioY-Protein codierendes Gen (schwarze Dreiecke) enthielten, wurden mit 4 nM [^3H]Biotin inkubiert und die zellossoziierte Radioaktivität zum Zeitpunkt Null bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400 nM unmarkiertem Biotin. Nach 1, 5, 10, 15, 20 bzw. 60 Minuten erfolgte jeweils eine Probennahme zur erneuten Bestimmung der zellossoziierten Radioaktivität. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Messungen mit daraus resultierender Standardabweichung. Das eingefügte Diagramm repräsentiert den Verlauf zwischen 20 und 60 Minuten.

Zum Zeitpunkt Null hatten Zellen mit BioMNY etwa halb so viel radioaktiv markiertes Biotin assoziiert wie Zellen mit BioY. Bei beiden Stämmen erfolgte während der einstündigen Inkubationszeit der Austausch von etwa 85 % des markierten Biotins gegen unmarkiertes Biotin. Im Falle von BioMNY stellten die übrigen 15,6 % mit hoher Wahrscheinlichkeit Transport des [^3H]Biotins in die Zelle dar. Im Falle von BioY waren nach 60 Minuten noch 14,6 % des radioaktiv markierten Biotins assoziiert. In den *in vitro*-Experimenten blieb im Falle von *RcBioY* nach Zugabe von unmarkiertem Biotin im Überschuss noch 13 % des radioaktiv markierten Biotins nach Inkubation über 10 Minuten an den Proteoliposomen assoziiert, während im Falle von *L/BioY* schon nach einer Minute keine assoziierte Radioaktivität an den Proteoliposomen gemessen werden konnte (Berntsson *et al.* 2012). *RcBioY* wies somit *in vitro* eine langsamere *Off*-Kinetik auf als *L/BioY*. Diese langsame *Off*-Kinetik könnte auch *in vivo* für die nach 60 Minuten beobachtete Menge an zellossoziierte Radioaktivität verantwortlich sein. Alternativ könnte es sich bei dem nach 60 Minuten detektierten Anteil der zellossoziierten Radioaktivität um in die Zellen transportiertes Substrat handeln.

Da auch die Daten des *in vivo*-Experiments keine abschließende Antwort darüber zuließen, ob BioY allein zum Biotintransport in der Lage war oder ob die Ergebnisse nur auf einen

Austausch an der Zelloberfläche hindeuteten, wurde ein physiologischer Test zum Nachweis der Transportfähigkeit von BioY-Proteinen *in vivo* durchgeführt. Die Funktion verschiedener BioY-Proteine wurde *in vivo* in einem biotinauxotrophen *E. coli*-Stamm analysiert, indem untersucht wurde, inwieweit das Wachstum der Zellen mit der intrazellulären Verfügbarkeit von Biotin korrelierte. In einem umfangreichen Ansatz wurden BioY-Proteine beider ECF-Subklassen sowie einzeln ohne T-Einheit im jeweiligen Organismus vorkommende BioY-Proteine analysiert. Es handelte sich dabei um folgende BioY-Proteine: *RcBioY*, *AtBioY* und *SmBioY* (Subklasse I), *L/BioY1* und *L/BioY2* (Subklasse II) sowie *RdBioY*, *BjBioY*, *RpBioY*, *SpBioY1*, *SpBioY2*, *ObBioY1* und *ObBioY2* (ohne T-Einheit im Organismus codiert). Für diese Proteine war durch Größenausschluss-Chromatografie (siehe Kapitel 2.1.1.2) gezeigt worden, dass sie *in vitro* Monomere und Dimere ausbilden. Weiterhin wurde das solitär vorkommende BioY-Protein aus *Roseovarius nubinhibens*, *RnBioY*, in die Untersuchungen einbezogen.

Alle BioY-Proteine waren nach Produktion in *E. coli*-Zellen funktionell, denn sie vermittelten die zelluläre Akkumulation radioaktiv markierten Biotins, wie in Abbildung 21 dargestellt ist.

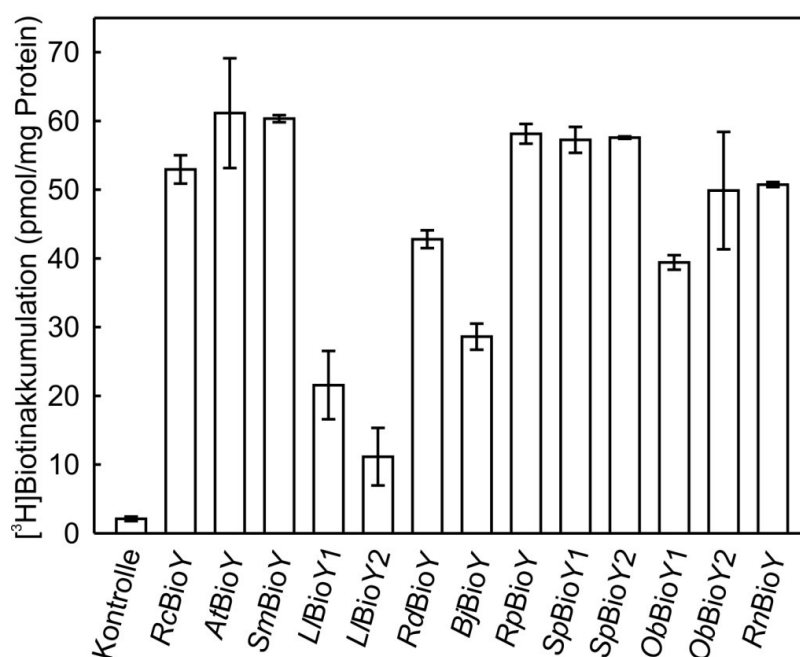


Abbildung 21: Biotinakkumulation durch unterschiedliche BioY-Proteine. Rekombinante *E. coli*-Zellen produzierten die BioY-Proteine aus zehn verschiedenen Organismen. Die Akkumulation radioaktiv markierten Biotins in den Zellen wurde analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen mit einem leeren Vektor. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehrfachen (zwischen zwei und acht) Wiederholungsmessungen mit daraus resultierender Standardabweichung.

Da die Akkumulation radioaktiv markierten Substrats keine Aussage darüber zulässt, ob die gemessenen Werte aus der Substratbindung an der Zelloberfläche, dem Substrattransport in die

Zellen oder einer Kombination aus beidem resultierten, wurde ein Wachstumstest etabliert, der die Biotintransportaktivität in die Zelle eindeutig nachweist. Die Idee bestand darin, einen biotinauxotrophen *E. coli*-Stamm mit unterbrochener Biotinsynthese zu verwenden, dem zusätzlich der intrinsische Biotintransporter fehlt. Die Expression von *bioY*-Genen sollte einen solchen Stamm zum Wachstum auf Spuren von Biotin befähigen, wenn die Genprodukte Biotintransport in die Zellen bewerkstelligen. Die Konstruktion eines solchen Stamms wurde durch zwei Umstände erschwert: (i) Die Natur des hochaffinen, natürlichen Biotintransporters von *E. coli* war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. (ii) Es musste ein Verfahren etabliert werden, um diesem biotinauxotrophen und -transportdefizienten Stamm das Wachstum zu ermöglichen. Hierbei war zu berücksichtigen, dass Biotin als Kofaktor der Acetyl-CoA-Carboxylase essenziell für die Fettsäurebiosynthese ist, weshalb völliges Fehlen von Biotin letal ist.

Mit der Identifizierung des Biotintransporters YigM (Ringlstetter 2010) war das unter (i) beschriebene Problem beseitigt. Es handelt sich bei YigM um einen sekundären Transporter der Carboxylat/Aminosäuren/Amin-Transporter-Familie (TC 2.A.78) mit hoher Affinität für Biotin, der keinerlei Ähnlichkeit zu ECF-Transportern besitzt.

Problem (ii) wurde durch Einbringen eines metabolischen „Bypasses“ gelöst. In Abbildung 22 A ist der Biotinsynthese- und Biotintransportweg von *E. coli* mit den beteiligten Enzymen dargestellt. Die Biotinsynthese wird durch die Methylierung eines Intermediats der Fettsäuresynthese, des Malonyl-Acyl-Carrier-Proteins (Malonyl-ACP), durch BioC initiiert. Nach zwei Kettenverlängerungen des Malonyl-ACP durch den Fettsäuresyntheseweg wird das Zwischenprodukt Pimeloyl-ACP-Methylester durch BioH demethyliert. Der resultierende Pimeloyl-Thioester dient als Ausgangspunkt für die ab hier universellen Reaktionen über 7-Keto-8-Amino-Pelargonsäure (KAPA), 7,8-Diamino-Pelargonsäure (DAPA) und Dethiobiotin zu Biotin. Die hierfür genutzten vier Enzyme werden in Bakterien auch mit BioF, BioA, BioD und BioB bezeichnet (Lin & Cronan 2011). Zur Überprüfung der Funktionalität des „Bypasses“ wurde in einer BioH-Mutante (*E. coli*-Stamm JW3375-1 aus der Keio-Kollektion, Baba *et al.* 2006) ein Plasmid eingebracht, das für die Pimelat:Coenzym-A-Ligase PimA aus *Rhodopseudomonas palustris* (Harrison & Harwood 2005) kodiert. In Vorversuchen war zu erkennen, dass dieser rekombinante Stamm in Minimalmedium wachsen konnte, sofern Pimelat zugesetzt war. In Zusammenarbeit mit Friedrich Finkenwirth wurde in diesem Stamm schließlich *yigM* deletiert (Finkenwirth *et al.* 2013).

Der Biotinsynthese- und Biotintransportweg des $\Delta bioH \Delta yigM$ PimA-Stamms bei Zugabe von Pimelat ist in Abbildung 22 B dargestellt.

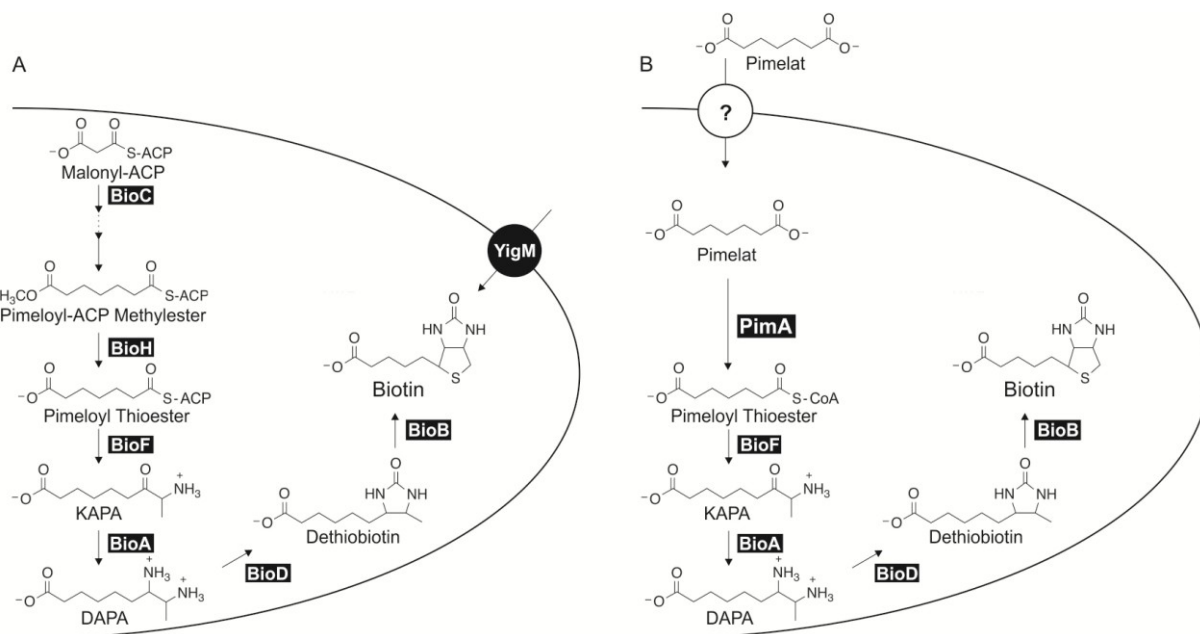


Abbildung 22: Biotinsynthese- und Biotintransportweg im *E. coli*-Wildtyp (A) und im biotindefizienten Referenzstamm (B). (A) Ausgangspunkt für die Biotinsynthese ist Malonyl-ACP welches durch BioC methyliert und durch BioH zur Biotinvorstufe Pimeloyl-Thioester umgewandelt wird. Anschließend erfolgt die Konvertierung über KAPA, DAPA und Dethiobiotin zu Biotin durch die Proteine BioF, A, D und B. YigM ist der natürliche Biotintransporter in *E. coli*. (B) Der $\Delta bioH \Delta yigM$ -Stamm kann Biotin weder aufnehmen noch selbst synthetisieren. Die Gegenwart von PimA erlaubt die Nutzung von Pimelat als Vorstufe für die Biotinsynthese. Abbildung entnommen aus Finkenwirth et al. (2013).

Der $\Delta bioH \Delta yigM$ -Referenzstamm wuchs in biotinfreiem Medium, sofern Pimelat zugesetzt und PimA produziert wurde, sowie in biotinhaltigem Minimalmedium bei einer Biotinkonzentration von 1 μM Biotin (Finkenwirth *et al.* 2013). Aus dem Wachstum bei 1 μM Biotin ergibt sich, dass *E. coli* möglicherweise zur Aufnahme von Biotin durch einen unbekannten alternativen Transporter mit niedriger Substrataffinität befähigt ist oder dass die zum Wachstum benötigten Spuren von Biotin bei hoher extrazellulärer Konzentration durch Diffusion in das Innere gelangen. Bei einer niedrigeren Biotinkonzentrationen von 1 nM Biotin im Minimalmedium war der $\Delta bioH \Delta yigM$ -Referenzstamm ohne Pimelat nicht zum Wachstum befähigt. Die Expression der *bioMNY*-Gene aus *R. capsulatus* ermöglichte erwartungsgemäß das Wachstum des $\Delta bioH \Delta yigM$ -Referenzstamms bei 1 nM Biotin, wie in Abbildung 23 zu sehen ist, und bestätigte somit die Funktionalität des Untersuchungssystems. Daher wurde das Wachstum der Zellen untersucht, welche RcBioY aus der Subklasse I, L/BioY1 bzw. L/BioY2 aus der Subklasse II oder das einzeln vorkommende BjBioY produzierten. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Abbildung 23 dargestellt. Zellen mit RcBioY, L/BioY1 oder L/BioY2 konnten bei 1 nM Biotin nicht wachsen. Die Produktion von L/BioY1 oder L/BioY2 hatte scheinbar einen wachstumshemmenden Effekt auf die Zellen. Verglichen

mit dem Wachstum des Kontrollstamms ohne für ein BioY-Protein codierendes Gen war das Wachstum der *L/BioY1* bzw. *L/BioY2* produzierenden Zellen bei 1 μ M Biotin reduziert. Ein ähnlicher für das Wachstum schädlicher Effekt wurde auch in Zellen mit *RcBioY* bei Biotinkonzentrationen zwischen 10 nM und 100 nM beobachtet (Finkenwirth 2013, Projektstudie) und erst bei einer Biotinkonzentration ab 1 μ M kompensiert. Zellen, die das einzeln vorkommende *BjBioY* produzierten, wuchsen bei 1 nM Biotin. Zellen, die *BjBioY*_[K166R] mit einer veränderten Substratbindestelle produzierten, wuchsen bei 1 nM Biotin nicht. Die sieben weiteren in Abbildung 21 gezeigten, einzeln vorkommenden BioY-Proteine ermöglichten nach Produktion im $\Delta bioH \Delta yigM$ -Referenzstamm ebenfalls das Wachstum der Zellen bei 1 nM Biotin (Finkenwirth *et al.* 2013). Diese Ergebnisse zeigten (i), dass BioY zum Transport von Biotin in die Zelle befähigt ist. Die für die acht untersuchten solitären BioY-Proteine beobachtete Transportfunktion ist spezifisch, da BioY-Varianten mit Aminosäureaustauschen in der Substratbindestelle, wie z. B. *BjBioY*_[K166R], die Transportfunktion nicht mehr besaßen (siehe dazu auch Finkenwirth *et al.* 2013). Es kann ausgeschlossen werden, dass die heterologe Überproduktion des Membranproteins BioY die Membranzusammensetzung dahingehend beeinflusste, dass eine verstärkte Durchlässigkeit für Biotin ein unspezifisches Eindringen des Substrats ermöglichte. Es kann (ii) für *RcBioY* und die beiden BioY-Proteine aus *L. lactis* aufgrund des schädlichen Effekts auf das Zellwachstum die Frage nach der Transportfunktion nicht abschließend beantwortet werden. Der Membranstress durch Biotinmangel sowie die Überproduktion der Membranproteine könnte den positiven Effekt der Biotinaufnahme kompensiert haben, was das Wachstum der Zellen bei 1 μ M Biotin bzw. im Falle von *RcBioY* bei 10 bis 100 nM Biotin gehemmt hat. Andererseits könnten sich auch einzeln vorkommende BioY-Proteine *in vivo* anders verhalten als BioY-Proteine mit spezifischem bzw. geteiltem Energetisierungsmodul, wodurch die solitären BioY-Proteine Transportfunktion aufweisen können, während BioY-Proteine mit Modul allein Biotin nicht in die Zelle transportieren können.

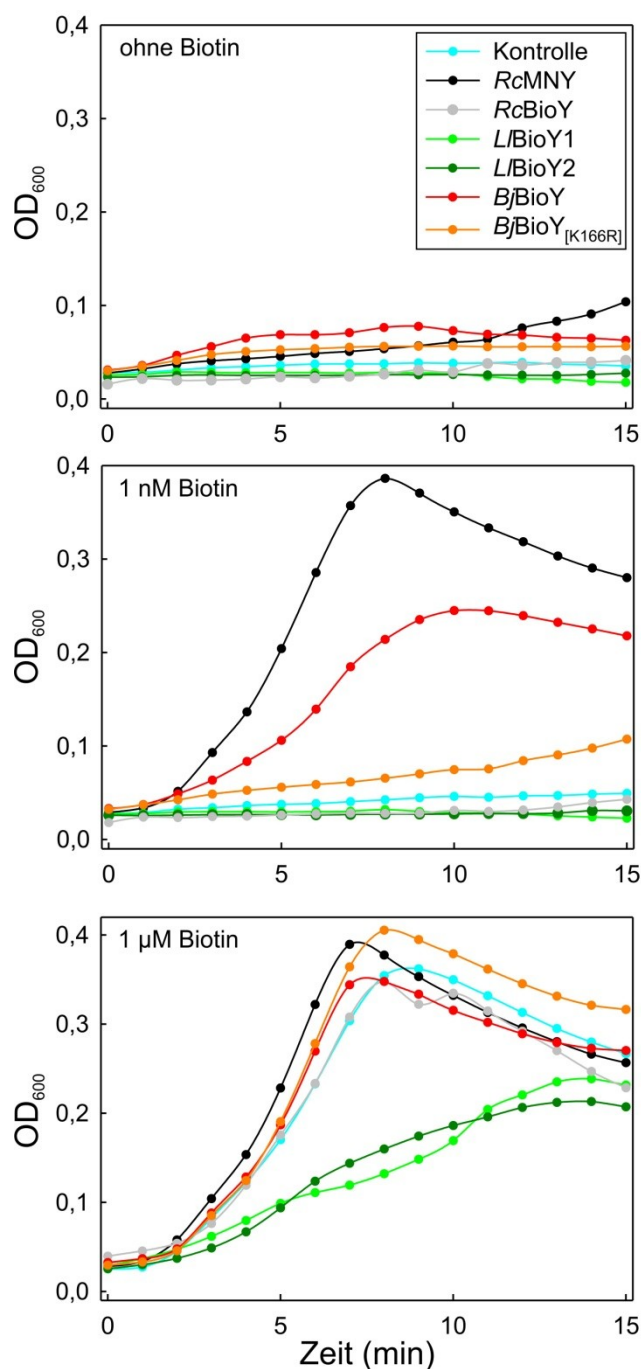


Abbildung 23: Wachstum von *E. coli-ΔbioH ΔyigM* mit unterschiedlichen BioY-Proteinen unter Biotinmangel. *E. coli*-Zellen wurden in Minimalmedium mit einer Startzelldichte von 0,05 bei Zugabe von 0,5 mM IPTG ohne Biotin oder mit 1 nM oder 1 μM Biotin bei 37 °C in Mikrotiterplatten inkubiert. Das Zellwachstum wurde mit einem Plattenlesegerät dokumentiert. Die *E. coli*-Zellen produzierten RcBioMNY (schwarz), RcBioY (grau), L/BioY1 (hellgrün), L/BioY2 (dunkelgrün), BjBioY (rot) oder BjBioY_[K166R] (orange). Als Kontrolle diente ein Vektor ohne für ein BioY-Protein codierendes Gen (hellblau). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus den Messwerten zweier biologischer Replikate. Parallel zu dieser Arbeit wurde durch Friedrich Finkenwirth gezeigt, dass acht ohne T-Einheit in den Organismen codierte BioY-Proteine Biotin transportieren und somit Wachstum vermitteln können (Finkenwirth *et al.* 2013).

2.3 Die Eigenschaften der S-Einheiten der Kobalt- und Nickeltransporter

Im Unterschied zu den S-Einheiten der Vitamintransporter war nicht genau bekannt, wie die S-Einheiten der Metalltransporter aufgebaut sind. Neben der A- und der T-Einheit sind zwei bis drei weitere Membranproteine im Operon codiert. Vorangegangene Arbeiten deuteten darauf hin, dass CbiMN die minimale Transporteinheit des Kobalttransporters CbiMNQO aus *R. capsulatus* darstellt. CbiM besitzt ebenso wie NikM mit sieben vorhergesagten Transmembranhelices eine ähnliche Größe wie die vitaminspezifischen S-Einheiten und Veränderungen des N-Terminus von CbiM verhindern den Substrattransport (Siche *et al.* 2010). CbiN, welches nur zwei Transmembranhelices aufweist, bindet nur schwach an den CbiMQO-Komplex, ist aber essentiell für die Funktion (Rodionov *et al.* 2006). Es stellte sich daher die Frage, ob CbiM bzw. NikM die zu den vitaminspezifischen S-Einheiten vergleichbaren Komponenten darstellten, welche man als S-Einheiten bezeichnen kann und die mit ein bis zwei zusätzlichen, essentiellen Komponenten interagieren oder ob die zwei bis drei Komponenten zusammen als substratbindende Einheit fungieren. Durch die Strukturbestimmung eines NikM-Proteins wurden hierzu wesentliche neue Erkenntnisse gewonnen.

2.3.1 Die Struktur von NikM

Im Zuge einer Kooperation mit der chinesischen Arbeitsgruppe um Maojun Yang wurde von den dortigen Kristallographen die 3D-Struktur eines der beiden NikM-Proteine (*Tt*NikM2) aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* gelöst (Yu *et al.* 2014). *Tt*NikM2 enthält entsprechend der topologischen Vorhersage (Rodionov *et al.* 2006) sieben Transmembranhelices. Überraschenderweise zeigten 3D-Strukturvergleiche eine sehr ähnliche Topologie der Helices 2-7 von *Tt*NikM2 im Vergleich mit den S-Einheiten der Vitamintransporter (Abbildung 24). Die r.m.s.d.-Werte bei paarweisen Strukturvergleichen lagen zwischen 3,0 Å und 3,3 Å bei 149 bis 162 verglichenen C α -Atomen, obwohl die Aminosäure-Sequenzidentität nur 14 bis 19 % beträgt (analysiert mit DALILITE, Holm & Rosenstrom 2010). Die erste Transmembranhelix von NikM, die in den S-Einheiten der Vitamintransporter nicht vorkommt, beginnt mit dem bereits als essentiell erkannten und konservierten N-terminalen Aminosäuremotiv (Siche *et al.* 2010), welches von außen in das Protein hineinragt.

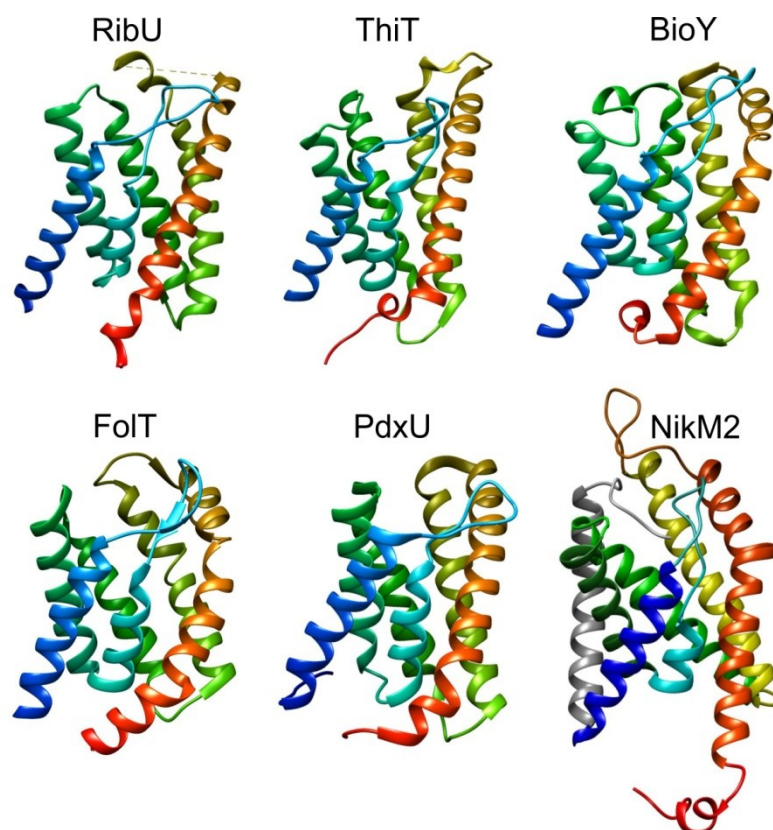


Abbildung 24: 3D-Modelle verschiedener S-Einheiten. Strukturen der Subklasse II-S-Einheiten RibU (PDB: 3p5n), ThiT (PDB: 3rlb), BioY (PDB: 4dve), FolT (PDB: 4huq) und PdxU (PDB: 4hzu) sowie der Subklasse I-S-Einheit NikM2 (PDB: 4m58) im Apozustand. Es wurde eine Blau-zu-Rot-Regenbogenfärbung über alle sechs Transmembranhelices genutzt, beginnend am N-Terminus (blau) bis zum C-Terminus (rot). Abweichend davon wurde die zusätzliche, erste Helix von NikM2 grau gefärbt. Alle PDB bearbeitet mit Chimera 1.7.

*Tt*NikM2 wurde sowohl mit einem gebundenen Nickelion als auch mit einem Kobaltion kristallisiert. Die Substratbindestelle besteht in beiden Fällen aus vier Stickstoffatomen, die von der N-terminalen Aminogruppe des Methionins an Position 1, vom Stickstoffatom des Peptidrückgrats sowie dem N δ 1-Atom des Imidazolrings von Histidin 2 und dem N δ 2-Atom des Imidazolrings von Histidin 67 geliefert werden. Die vier Stickstoffatome bilden ein quadratisch-planares Ligandenfeld, das in Abbildung 25 A dargestellt ist. Die Struktur der Substratbindestelle wird durch ein ausgeprägtes Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Yu *et al.* 2014). An der Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzes beteiligte Aminosäuren sind Met1, His2, Thr65, His67, Ala68, Ile69, Gln94, Met186, His190 und Glu198, die in Abbildung 25 A markiert sind. In Abbildung 25 C ist das Wasserstoffbrückennetz vergrößert dargestellt.

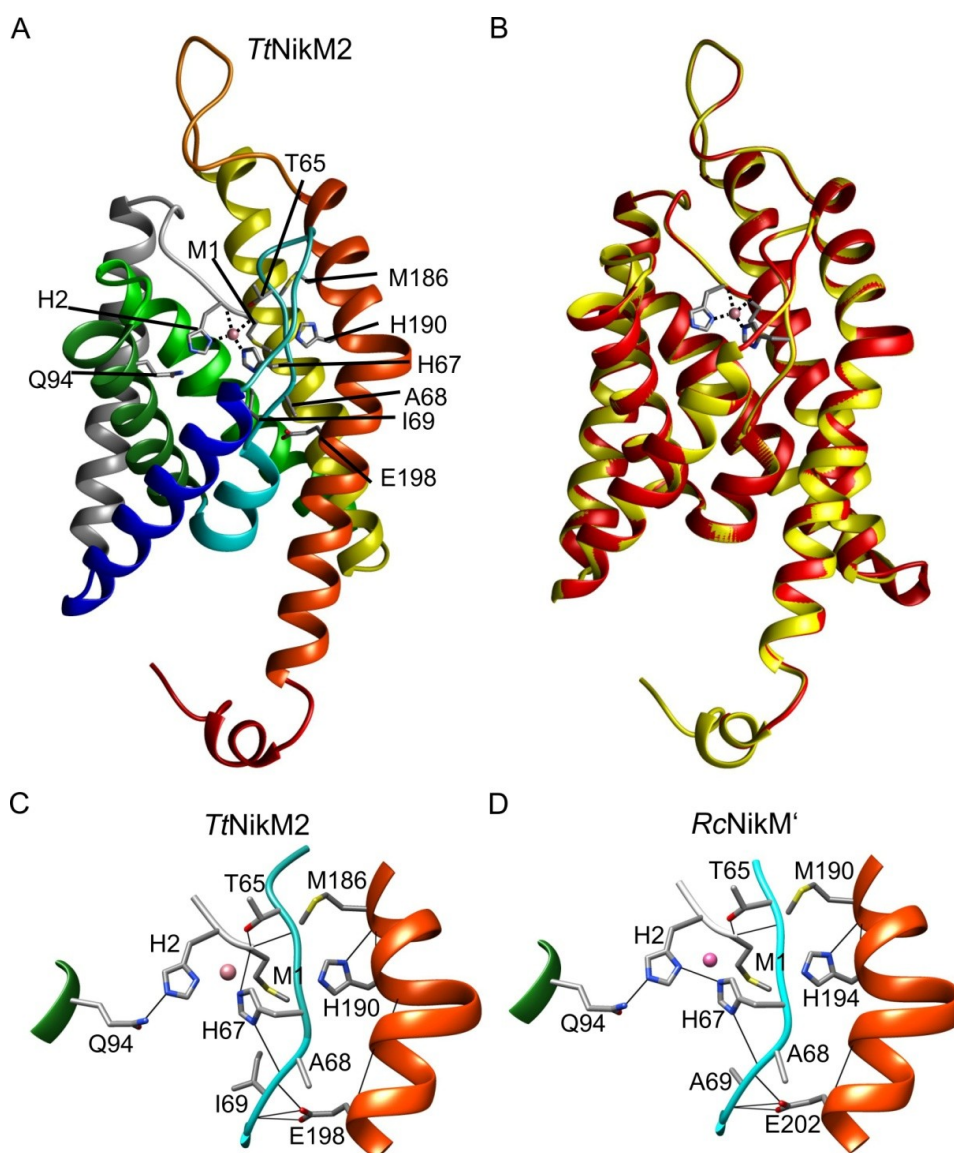


Abbildung 25: Die Substratbindestelle von *TtNikM2* bzw. *RcNikM'*. (A) zeigt das 3D-Modell von *TtNikM2* (PDB: 4m58) mit Helix 1 in grau und einer Blau-zu-Rot-Regenbogenfärbung beginnend mit Helix 2. Die Aminosäurereste, die an der Nickelbindung bzw. am Wasserstoffbrückennetz beteiligt sind, sind im Bändermodell hervorgehoben (N: blau, O: rot, S: gelb) und benannt. Die Substratbindestelle ist durch gestrichelte Linien symbolisiert. (B) zeigt das Strukturalignment von *TtNikM2* (gelb) und *RcNikM'* (rot). Der “M“-Teil von *RcNik(MN)* wurde mit SWISS-MODEL nach PDB 4m58 modelliert. Eine Vergrößerung des Wasserstoffbrückennetzes ist in (C) für *TtNikM2* und in (D) für *RcNikM'* zu sehen. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze Linien, Nickel ist als rosa Ball dargestellt. Alle Abbildungen wurden mit Chimera 1.7 generiert.

Für den Nachweis der biologischen Relevanz sollten die an der Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzes beteiligten Aminosäuren verändert und die Auswirkungen auf die Funktion von NikM analysiert werden. Nickel- bzw. Kobaltaufnahme von *E. coli*-Zellen, welche *TtNikM2* allein oder *TtNikM2N2* produzierten, konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Dies könnte damit erklärbar sein, dass NikM2 und NikN2 aus dem thermophilen

T. tengcongensis bei 37 °C im mesophilen *E. coli* keine funktionelle Einheit ergeben. Die Untersuchungen wurden deshalb mit *RcNik(MN)QO* durchgeführt. *R. capsulatus* besitzt ein fusioniertes Nik(MN) und dessen M-Komponente ist hochgradig ähnlich zu *TtNikM2*. Zur Modellierung des NikM-Teils (*RcNikM'*) wurden die Aminosäuren Methionin 1 bis Prolin 230 des Fusionsproteins mit *TtNikM2* als Matrize modelliert. *TtNikM2* und *RcNikM'* besitzen eine Sequenzübereinstimmung von 47 % und die Topologie beider Proteine ist nahezu identisch, wie in Abbildung 25 B zu sehen ist. Der r.m.s.d.-Wert betrug 0,1 Å bei 219 verglichenen C α -Atomen. Es konnte für *RcNikM'* ein ähnliches Wasserstoffbrückennetz abgeleitet werden, wie es für *TtNikM2* anhand der Strukturdaten errechnet wurde. Dieses potentielle *RcNikM'*-Wasserstoffbrückennetz ist in Abbildung 25 D dargestellt.

Im Alignment der Proteinsequenzen von *TtNikM2* und *RcNikM'* in Abbildung 26 A sind diejenigen Aminosäuren durch Umrahmung markiert, denen aufgrund der Strukturdaten zentrale Rollen für die Substratbindung und die Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzes zugeschrieben worden waren. Die meisten dieser Aminosäurereste sind stark konserviert, wie ein Alignment aller 102 in der SEED-Datenbank hinterlegten NikM-Sequenzen zeigte. Ein Auszug von 36 verglichenen NikM-Sequenzen ist im Anhang in Abbildung 50 zu finden. An einigen Positionen gibt es eingeschränkte Variabilität insofern, dass chemisch ähnliche Aminosäuren vorkommen (65: T oder S; 68/69: V, L, A oder I). An anderen Positionen beträgt die Konservierung der Aminosäuren zwischen 61 % (M190) und 99 % (H67). Weitere stark konservierte Aminosäuren wie A48, G79 oder T206 (mindestens 86 %) sowie G70 und D100 (66 % bzw. 60 %), wurden ebenfalls als strukturell essentielle oder für die Substratbindung potentiell wichtige Aminosäuren vermutet. Die möglicherweise an der Substratbindung beteiligten Aminosäurereste sind in Abbildung 26 B für *RcNikM'* dargestellt. Zehn dieser Aminosäurereste wurden in *RcNik(MN)QO* ausgetauscht, um die 17 in Abbildung 26 A benannten Varianten zu erhalten. Die essentielle Rolle von Met1, His2 und weiterer N-terminaler Aminosäurereste war bereits durch Untersuchungen des sehr ähnlichen *RcCbiM* bekannt (Siche *et al.* 2010).

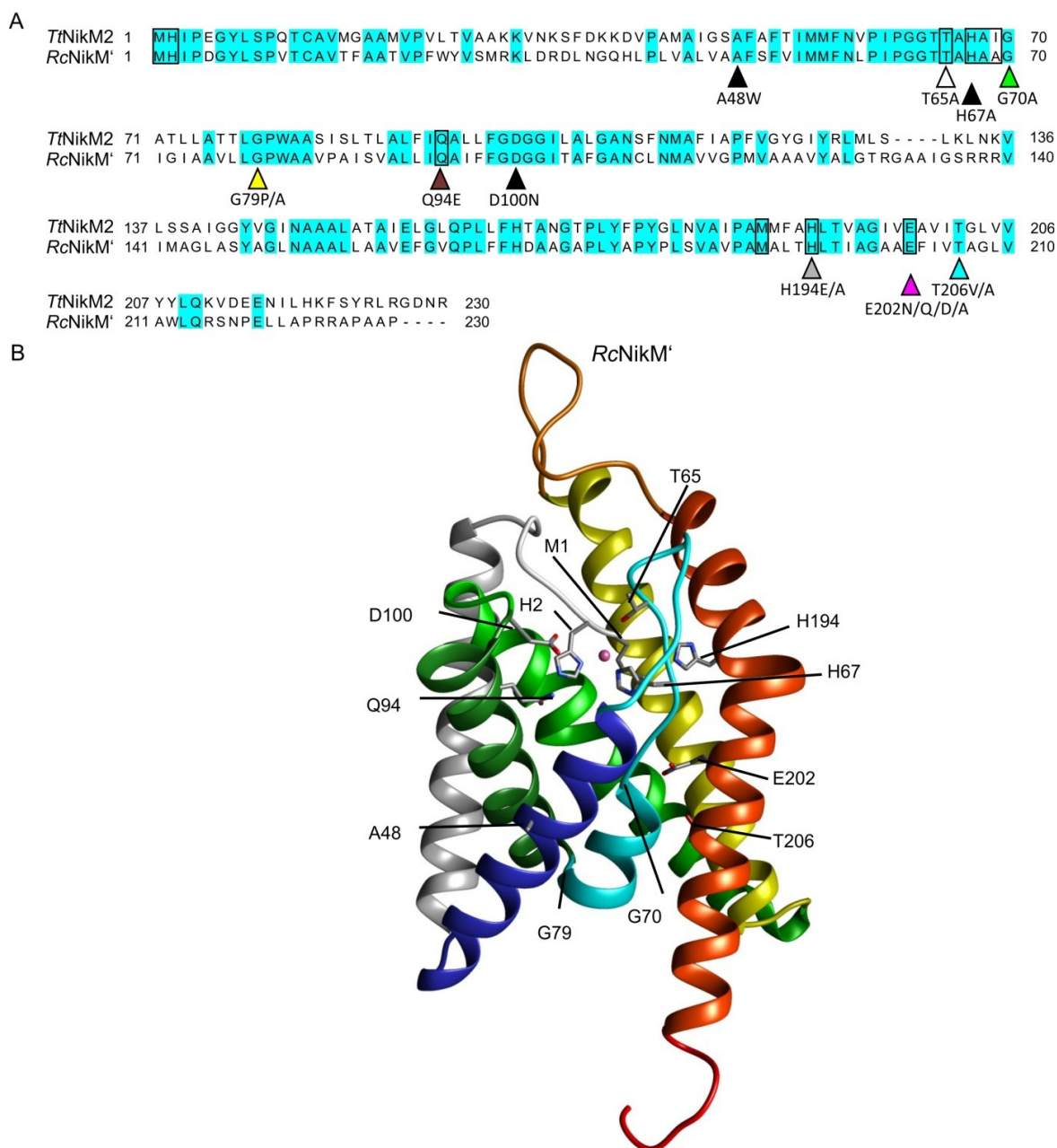


Abbildung 26: In *RcNikM'* für die Substratbindung potentiell wichtige Aminosäuren. (A) Alignment von *TtNikM2* und *RcNikM'* – letzteres entspricht dem “M“-Teil von *RcNik(MN)*. Sequenzübereinstimmungen sind hellblau markiert. In *TtNikM2* strukturell als wichtig identifizierte Aminosäuren sind umrahmt. Die 17 in *RcNik(MN)*QO erzeugten Varianten sind unter Angabe der Ausgangs- und Zielamino-säuren benannt. Die Farbgebung dient der visuellen Unterscheidung der Varianten im folgenden Experiment zur $^{63}\text{Ni}^{2+}$ -Akkumulation (Abbildung 27). **(B)** 3D-Modell von *RcNikM'*, modelliert nach PDB 4m58, bearbeitet mit Chimera 1.7. Die für die Substratbindung potentiell wichtigen Aminosäuren sind im Bändermodell (N: blau, O: rot, S: gelb) hervorgehoben, Nickel ist als rosa Ball illustriert.

Rekombinante *E. coli*-Zellen, welche das wildtypische *RcNik(MN)*QO oder eine der 17 Varianten produzierten, wurden in Gegenwart radioaktiv markierten Nickels kultiviert und die Nickelakkumulation in den Zellen wurde bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 zusammengefasst.

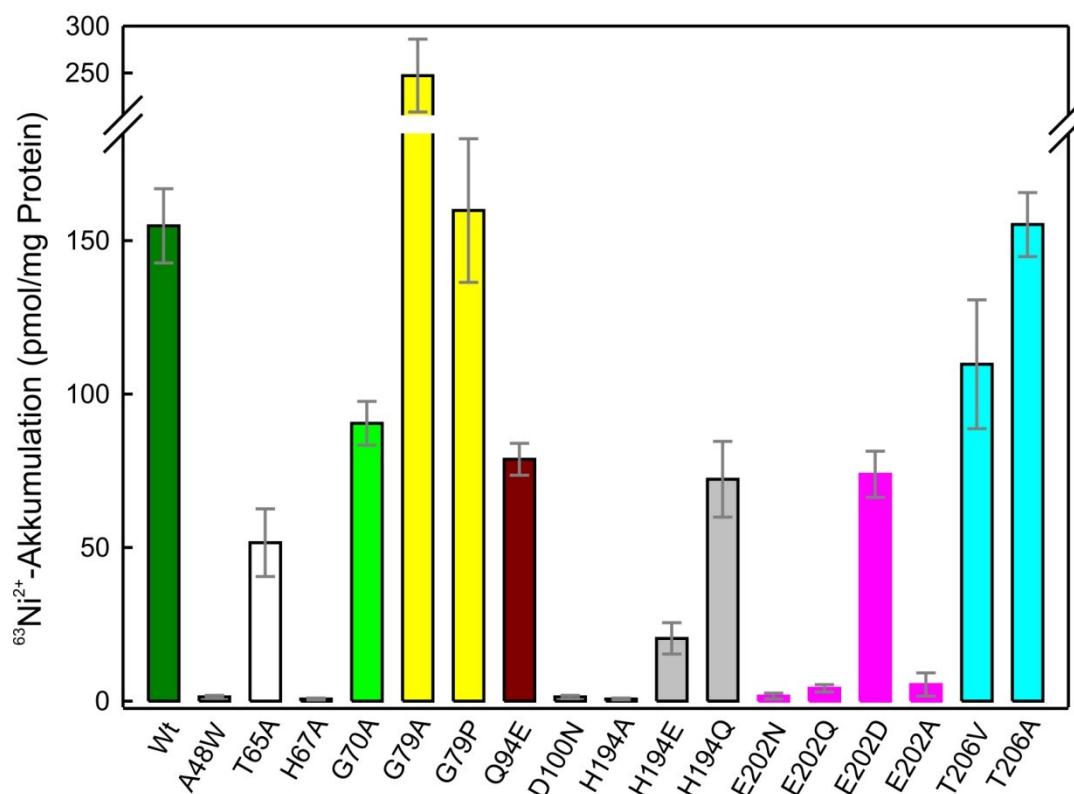


Abbildung 27: Einfluss konservierter Aminosäuren auf die Funktion von RcNik(MN)QO. *E. coli*-Zellen mit RcNik(MN)QO-Varianten wurden in Gegenwart von $^{63}\text{Ni}^{2+}$ inkubiert. Danach wurde die Akkumulation radioaktiv markierten Nickels in den Zellen bestimmt. Die Bezeichnung der Aminosäureaustausche entspricht Abbildung 26 A. Die Farbgebung dient der visuellen Unterscheidung der Varianten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei bis neun Wiederholungsmessungen mit daraus resultierender Standardabweichung und sind zum Teil in Yu et al. (2014) publiziert. Wt: Wildtyp (dunkelgrün).

Wie erwartet waren Zellen, welche die Variante RcNik(M_[H67A]N)QO produzierten, nicht zur Akkumulation von Nickel befähigt, da durch den Austausch einer der vier Liganden des Nickelions entfernt wurde.

Weitere nicht-funktionelle Nik(MN)QO-Varianten waren jene mit den Aminosäureaustauschen A48W, D100N, H194A und E202N/Q/A. Alle anderen Varianten vermittelten Akkumulation radioaktiv markierten Nickels in den Zellen, wiesen aber zum Teil reduzierte Aktivitäten gegenüber dem Wildtyp auf. Am stärksten war die Funktion der H194E-Variante reduziert, während die Varianten mit den Aminosäureaustauschen T65A, G70A, Q94E, H194Q und E202D etwa 30-60 % der Aktivität des Wildtyps aufwiesen. Die Varianten mit den Austauschen G79P sowie T206V/A besaßen annähernd Wildtypaktivität und die Variante G79A zeigte erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die teilweise starken Auswirkungen der Aminosäureveränderungen deuteten darauf hin, dass das berechnete Wasserstoffbrückennetz eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung der Substratbindestelle spielte.

Da sich die meisten der durch strukturelle Beobachtungen in *Tt*NikM2 identifizierten Reste für *Rc*Nik(MN)QO als essentiell herausgestellt hatten, deutete dies darauf hin, dass die Bindung der Metallionen durch *Rc*NikM' in gleicher Weise erfolgt wie durch *Tt*NikM2. Die NikM-Proteine stellen somit die S-Einheiten der Metalltransporter dar und unterscheiden sich von den S-Einheiten der Vitamintransporter nur durch die N-terminale Helix, die in die Substratbindetasche hineinragt.

Da CbiM ebenfalls einen konservierten N-Terminus besitzt und Aminosäureaustausche in diesem Bereich die Funktion von CbiMN verhinderten, war stark anzunehmen, dass CbiM und NikM eine ähnliche Struktur besitzen. Die Struktur von *Rc*CbiM wurde anhand derjenigen von *Tt*NikM2 modelliert, wie in Abbildung 28 zu sehen ist. Erwartungsgemäß war die Topologie mit einem r.m.s.d.-Wert von 1,0 Å bei 212 verglichenen Ca-Atomen und einer Sequenzübereinstimmung von 26 % sehr ähnlich.

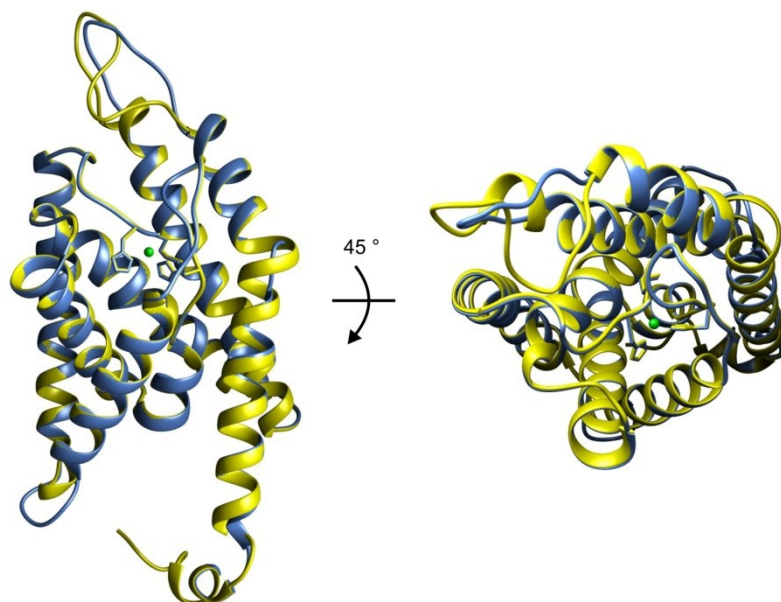


Abbildung 28: Topologievergleich zwischen *Tt*NikM2 (gelb) und *Rc*CbiM (blau). Das 3D-Modell von *Rc*CbiM wurde mit SWISS-MODEL nach PDB 4m58 erstellt. Die Strukturen wurden in Chimera 1.7 bearbeitet und die Aminosäurereste, welche die quadratisch-planaren Substratbindestellen ausbilden (*Tt*NikM2: Met1, His2, His67; *Rc*CbiM: Met1, His2, His69), sind als Bändermodell dargestellt. Kobalt ist als grüner Ball dargestellt.

Die strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten von NikM und CbiM zeigen, dass CbiM ebenso wie NikM die S-Einheit darstellt. Die zusätzlichen Komponenten wie CbiN bzw. NikN oder NikK und NikL sind zwar essentiell für die Funktion als minimale Transporteinheit, jedoch ist bisher noch ungeklärt, worin genau deren Aufgabe besteht.

2.3.2 Die S-Einheit und ein zusätzliches Transmembranprotein stellen die minimale Transporteinheit dar

Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass die Produktion von CbiMNQO aus *R. capsulatus* (Siche *et al.* 2010) oder *S. Typhimurium* (Rodionov *et al.* 2006) in *E. coli* in erheblichem Umfang die Akkumulation von $^{57}\text{Co}^{2+}$ in den Zellen bewirkte. CbiMNQO vermittelte ebenfalls die Akkumulation von $^{63}\text{Ni}^{2+}$ in den Zellen (Rodionov *et al.* 2006). Ebenfalls zeigten Zellen, welche Nik(MN)QO aus *R. capsulatus* rekombinant produzierten, die Akkumulation von $^{63}\text{Ni}^{2+}$ (Rodionov *et al.* 2006). Untersuchungen der Subkomplexe CbiMNQ, CbiMN oder CbiM aus *S. Typhimurium* (Rodionov *et al.* 2006) bzw. CbiMNQ, CbiMN, CbiM oder CbiMQO aus *R. capsulatus* (Siche *et al.* 2010) zeigten, dass CbiMN die minimale, funktionelle Einheit darstellte. In Kenntnis der hochaffinen Bindung der Substrate durch die S-Einheiten der Vitamintransporter sowie der schnellen *On*-, aber langsamen *Off*-Kinetik von *RcBioY* (Berntsson *et al.* 2012) war jedoch auch für die S-Einheiten der Metalltransporter fraglich, in welchem Anteil Substratbindung an und Substrattransport in die Zellen die Messwerte der zellassoziierten Radioaktivität beeinflussten. Für BioY konnte der Transport von Biotin ohne das ECF-Modul durch einen Wachstumstest mittels eines biotindefizienten *E. coli*-Stamms nachgewiesen werden. Im Fall der Metalltransporter wurde diese Frage durch Analyse der Aktivität eines intrazellulären, nickelabhängigen Enzyms überprüft. Verwendet wurde die Urease aus dem Enterobakterium *Klebsiella aerogenes* (Todd & Hausinger 1987, Mulrooney *et al.* 1989).

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Fähigkeiten zur Akkumulation von $^{63}\text{Ni}^{2+}$ oder $^{57}\text{Co}^{2+}$ durch Zellen verglichen, die *RcCbiMNQO* bzw. *RcNik(MN)QO* oder die Subkomplexe CbiMN bzw. Nik(MN) enthielten. Inaktive Varianten mit dem H2-Austausch im N-Terminus – H2D bei CbiM und H2Y in NikM – dienten als Negativkontrollen. Einzelnes CbiM wurde ebenfalls als Negativkontrolle verwendet. Die Menge an in den Zellen akkumulierten, radioaktiv markierten Metallionen wurde bestimmt und die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

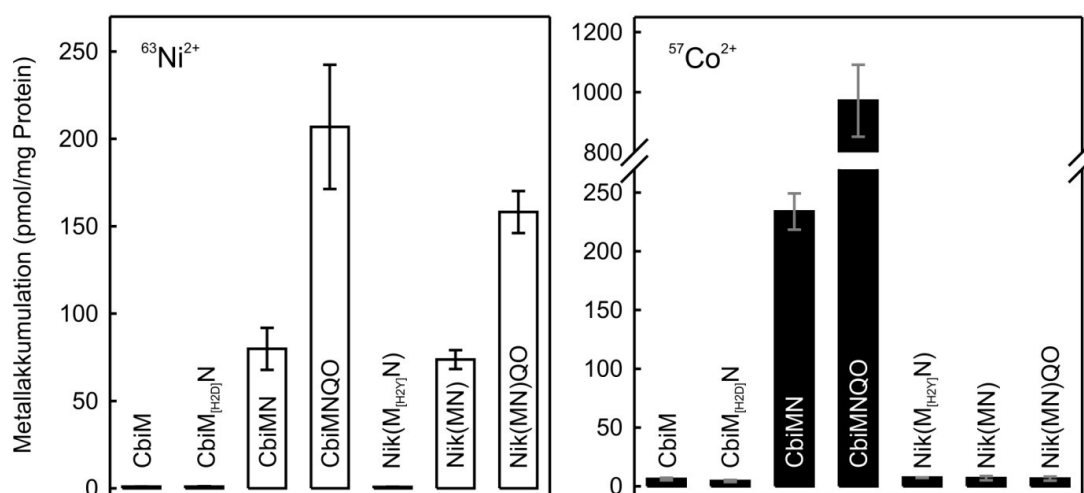


Abbildung 29: Akkumulation von $^{63}\text{Ni}^{2+}$ (weiß) oder $^{57}\text{Co}^{2+}$ (schwarz) in rekombinanten *E. coli*-Zellen mit verschiedenen Varianten der Metalltransporter. Die Zellen produzierten CbiMNQO bzw. Nik(MN)QO, die davon abgeleiteten Varianten CbiM, CbiMN oder Nik(MN) oder die inaktiven Varianten CbiM_[H2D]N oder Nik(M_[H2Y]N). Die Zellen wurden für 7 h mit $^{63}\text{Ni}^{2+}$ oder $^{57}\text{Co}^{2+}$ inkubiert und es wurde die Menge an akkumuliertem, radioaktiv markiertem Metall in den gewaschenen Zellen bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus der Messung von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten mit daraus resultierender Standardabweichung.

Die schon bekannten Beobachtungen, dass (i) CbiMNQO in Zellen die Akkumulation von Nickel und Kobalt vermittelte, während (ii) Zellen mit Nik(MN)QO nur $^{63}\text{Ni}^{2+}$ akkumulierten und (iii) die S-Einheit CbiM allein nicht die Akkumulation von $^{57}\text{Co}^{2+}$ vermitteln konnte, aber (iv) CbiMN als minimale funktionelle Einheit fungierte, wurden bestätigt. Sowohl CbiMNQO als auch CbiMN besaßen eine deutliche Präferenz für Kobalt. Zellen mit den inaktiven Varianten CbiM_[H2D]N bzw. Nik(M_[H2Y]N) waren erwartungsgemäß nicht zur Metallakkumulation befähigt. Wie nicht anders zu erwarten, war Nik(MN) in Gegenwart von $^{57}\text{Co}^{2+}$ ebenso wenig funktionell wie der vollständige Nickeltransporter. Zellen mit Nik(MN) waren jedoch in der Lage, $^{63}\text{Ni}^{2+}$ zu akkumulieren, wobei Nik(MN) etwa 50 % der Aktivität von Nik(MN)QO aufwies. Auch CbiMN vermittelte die Akkumulation von $^{63}\text{Ni}^{2+}$ und besaß etwa 40 % der Aktivität des kompletten Kobalttransporters.

Zur Klärung der Frage, ob die Akkumulation radioaktiv markierter Metallionen aus der Substratbindung an oder dem Substrattransport in die Zellen resultierte, wurde die Aktivität des nickelabhängigen Enzyms Urease in Zellen analysiert, die unterschiedliche Cbi- bzw. Nik-Varianten enthielten. Die Urease aus *K. aerogenes* besteht aus einem Trimer der drei Proteine UreA, UreB und UreC. Vier akzessorische Proteine, UreD, F, G und UreE, sind zur Reifung der Urease vom Apoprotein zur aktiven, mit sechs Nickelionen beladenen Form nötig und müssen daher in *E. coli* koproduziert werden. In Abbildung 30 ist die Reifung der aktiven Urease dargestellt. Neben Guanosintriphosphat (GTP) ist die Reifung der Urease vom Einbau

des Nickelions als Kofaktor durch UreE abhängig. UreE bindet Ni^{2+} und liefert es an den Reifungskomplex aus Ure(ABCDG)_3 (Farrugia *et al.* 2013). Da Ni^{2+} einen essentiellen Kofaktor des Urease-Enzyms darstellt, korreliert die durch Quantifizierung der Produkte der Harnstoffspaltung nachweisbare Ureaseaktivität mit dem Gehalt an intrazellulärem Nickel.

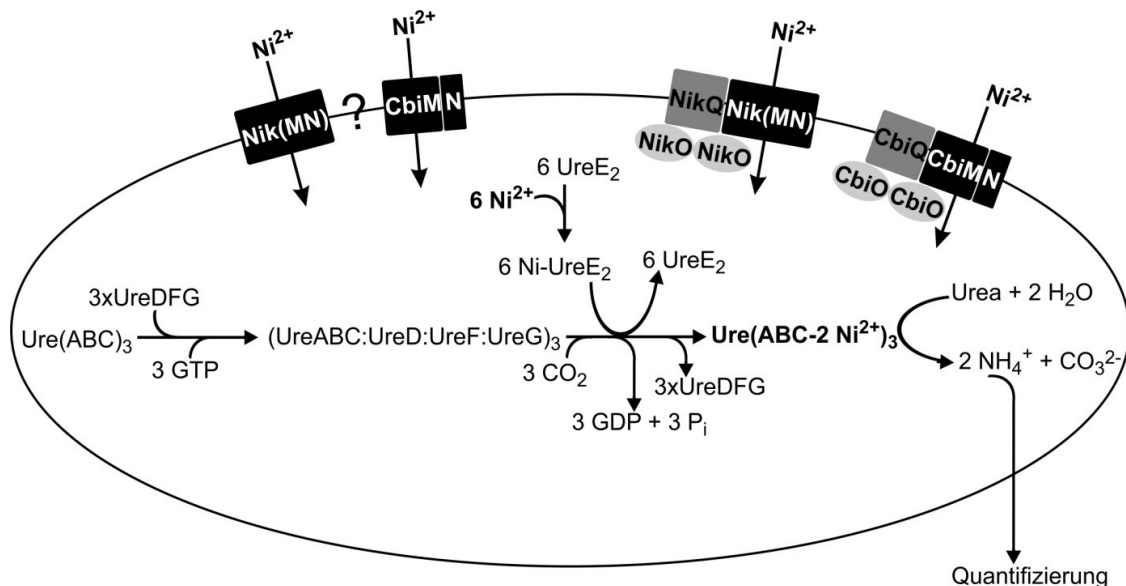


Abbildung 30: Reifung der Urease. Das Apoprotein, ein Trimer aus einem UreABC-Trimer wird GTP-abhängig durch den UreDFG-Komplex aktiviert und Nickel wird dem Komplex durch das UreE-Dimer zugeführt (siehe Farrugia *et al.* 2013). Das aktive Enzym enthält insgesamt sechs Nickelionen; seine Aktivität dient deshalb als Indikator für die intrazelluläre Nickelkonzentration und somit auch für die Transportaktivität der verschiedenen Cbi- bzw. Nik-Varianten.

Die Ureaseaktivität der Zellen, welche die Urease und je eine der Cbi- oder Nik-Varianten enthielten, wurde bestimmt und ist in Abbildung 31 dargestellt. Zellen, die die Holotransporter Nik(MN)QO oder CbiMNQO produzierten, zeigten wie erwartet die höchste Ureaseaktivität in Medium, zu welchem 500 nM NiCl_2 zugesetzt worden war. Beide Holotransporter führten auch zu niedriger, aber detektierbarer Ureaseaktivität der Zellen, die in Vollmedium kultiviert wurden, welchem kein NiCl_2 zugesetzt worden war. Dies ist erklärbar dadurch, dass Vollmedium Spuren von Nickel enthalten kann. Zellen, welche die inaktiven Varianten CbiM_[H2D]N oder Nik(M_[H2Y])N produzierten, enthielten dagegen nur Hintergrundaktivität. Ebenso wiesen Zellen, die nur die S-Einheit CbiM enthielten, keine Ureaseaktivität oberhalb der Hintergrundaktivität auf. Nik(MN) führte in Zellen, die ohne Nickel kultiviert wurden, zu einer geringen, aber über das Hintergrundlevel erhöhten Ureaseaktivität. Sowohl CbiMN als auch Nik(MN) führten in Medium mit 500 nM NiCl_2 zu deutlicher Ureaseaktivität, die sich signifikant von der Aktivität im nicht mit Nickel versetzten Medium unterschied. Die Enzymaktivität betrug im Vergleich zum jeweiligen Holotransporter im Falle von CbiMN etwa

30 % und im Falle von Nik(MN) etwa 25 %. Diese Verhältnisse spiegeln in etwa die Ergebnisse der Metallakkumulationsmessungen wider und belegen klar, dass CbiMN und Nik(MN) auch ohne ihre A- und T-Einheiten Nickel in die Zelle transportieren können. Da CbiM bzw. NikM die substratbindenden Einheiten darstellen, könnte die Funktion der jeweiligen „N“-Komponente bei der Substratfreisetzung in das Cytoplasma zu suchen sein.

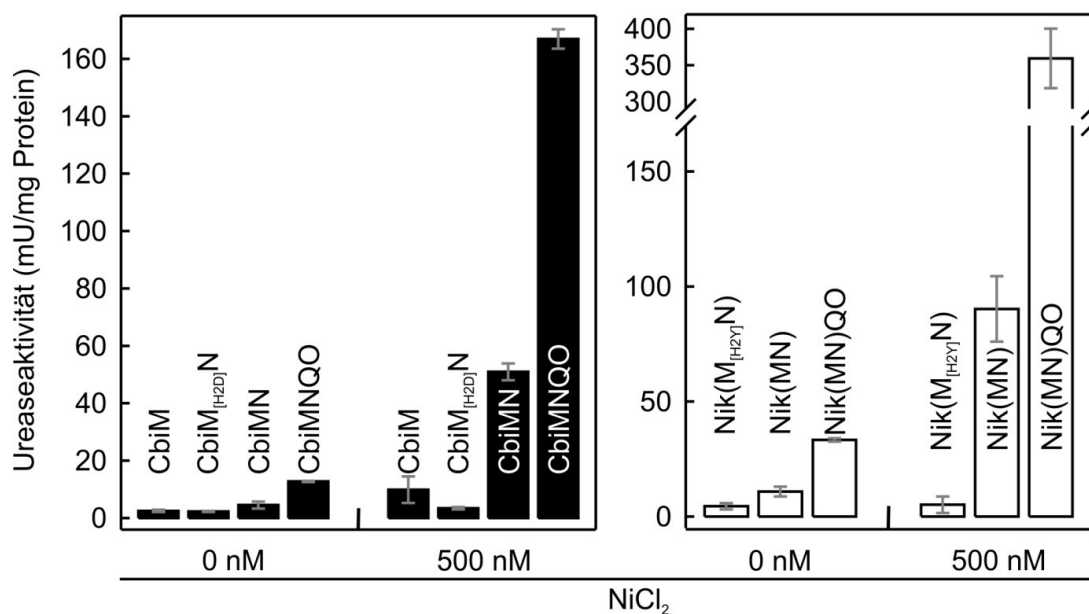


Abbildung 31: Ureaseaktivität von *E. coli*-Zellen, die ECF-Transportervarianten sowie die Urease aus *K. aerogenes* produzierten. Rekombinante *E. coli*-Zellen produzierten UreABCDFGE sowie CbiMNQO-Holotransporter (schwarz), Nik(MN)QO-Holotransporter (weiß), davon abgeleitete Subkomplexe oder Subkomplexe mit einem inaktivierenden Aminosäureaustausch (H2D bzw. H2Y). Die Zellen wurden 6,5 h in Vollmedium ohne (0 nM) oder mit Zugabe von 500 nM NiCl₂ kultiviert. Die Ureaseaktivität diente als Indikator für die intrazelluläre Ni²⁺-Konzentration und wurde durch Quantifizierung von aus Harnstoff freigesetzten Ammoniumionen ermittelt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Wiederholungsmessungen mit daraus resultierender Standardabweichung.

2.3.3 Eigenschaften von MN-Subkomplexen

CbiM stellt die S-Einheit der metallspezifischen ECF-Transporter dar, ist aber nur zusammen mit der zusätzlichen Komponente CbiN zum Transport von Nickel oder Kobalt in die Zellen befähigt. Die essentielle, noch ungeklärte Funktion der „N“-Komponenten steht im Kontrast zu deren nur schwacher Interaktion mit dem Komplex aus A-, T- und S-Einheit, wie sie für *RcCbiN* beobachtet wurde (Siche *et al.* 2010). Der für den Transportvorgang essentielle, möglicherweise aber nur transiente Interaktionszustand zwischen CbiM und CbiN konnte jedoch durch die nur lockere Bindung von CbiN an CbiM *in vitro* nicht weiter analysiert werden. Daher wurde analog zu den natürlicherweise vorkommenden Nik(MN)-Fusionen ein

dauerhafter Interaktionszustand von CbiN mit CbiM in Form der Cbi(MN)-Variante erzeugt und *in vitro* untersucht (Siche *et al.* 2010). Nach der Affinitätschromatografischen Reinigung über den C-terminalen Strep-tag zeigten sich in der anschließenden SDS-PAGE zwei Konformationen mit unterschiedlichem Laufverhalten. Sowohl die langsamer laufende als auch die schneller laufende Form reagierten mit Anti-Strep-Tactin-Antikörpern, sodass C-terminale Proteolyse ausgeschlossen war. Es wurden durch Edman-Abbau auch identische N-Termini beider Formen ermittelt, die jeweils Met1 enthielten, sodass auch N-terminale Proteolyse als Ursache für die erhöhte Mobilität auszuschließen war (Siche *et al.* 2010). In der beschriebenen Studie war die aktive wildtypische Form mit der inaktiven H2D-Variante verglichen worden. Cbi(M_[H2D]N) zeigte im Unterschied zu Cbi(MN) nur die langsamer laufende Form bei Auftrennung mittels SDS-PAGE (Siche *et al.* 2010).

Veränderungen der ersten neun Aminosäuren des N-Terminus (₁MHIMEGFLP₉) von CbiM in der Cbi(MN)-Fusion zeigten, dass außer den Varianten M4A und M4S alle anderen Cbi(MN)-Varianten inaktiv sind (Siche *et al.* 2010). Daher wurde das elektrophoretische Laufverhalten von 13 Cbi(MN)-Varianten mit dem Laufverhalten von Cbi(MN) und Cbi(M_[H2D]N) verglichen. Nach der Affinitätschromatografischen Reinigung über den C-terminalen Strep-tag zeigte sich in der anschließenden Tricin-SDS-PAGE, dass alle aktiven Varianten in zwei Konformationen vorlagen, während bei inaktiven Varianten nur die langsam wandernde Form existierte, wie in Abbildung 32 zu sehen ist.

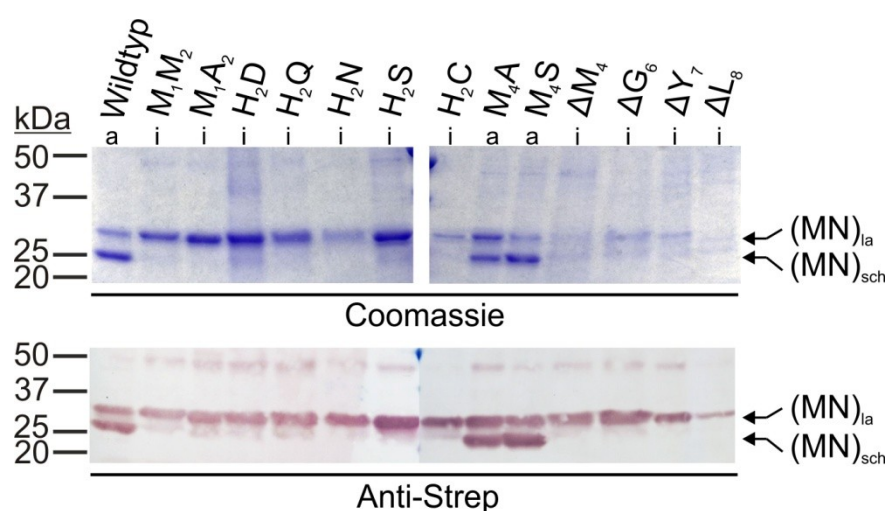


Abbildung 32: Verschiedene elektrophoretische Laufformen von Cbi(MN)-Varianten. Nach Affinitätschromatografie, Auftrennung der 13 Cbi(MN)-Varianten und des Wildtyps mittels Tricin-SDS-PAGE und Detektion mittels Coomassie oder Western-Blot mit Anti-Strep-Tactin-Antikörpern zeigte der Wildtyp und die ebenfalls transportaktiven (a) M4A- und M4S-Varianten zwei Proteinbanden: eine schnell laufende, (MN)_{sch}, und eine langsam laufende, (MN)_{la}. Alle anderen, inaktiven (i) Varianten wiesen ausschließlich die langsam laufende Form auf.

Durch die Korrelation von Laufform und Transportaktivität nicht nur beim Wildtyp, sondern auch innerhalb des größeren Datensatzes bei den M4A- und M4S-Varianten kann vermutet werden, dass das Hineinragen der ersten transmembranen Helix in die Substratbindestelle und die Koordinierung eines Metallions bei den aktiven Varianten möglicherweise die vollständige Denaturierung durch SDS verhindert, wodurch größere Mobilität in der SDS-PAGE hervorgerufen würde.

In einem ähnlichen Ansatz wurden auch Nik(MN)-Varianten untersucht. Nach affinitätschromatografischer Reinigung von *Rc*Nik(MN) sowie der inaktiven *Rc*Nik(M_[H2Y]N)-Variante jeweils über den C-terminalen FLAG-tag zeigte sich in der anschließenden Tricin-SDS-PAGE, dass die beiden Varianten keine unterschiedlichen Mobilitätsformen aufwiesen. Die nach Coomassiefärbung oder nach Western-Blot mit Anti-FLAG-Antikörpern detektierten Proteine sind in Abbildung 33 zu sehen.

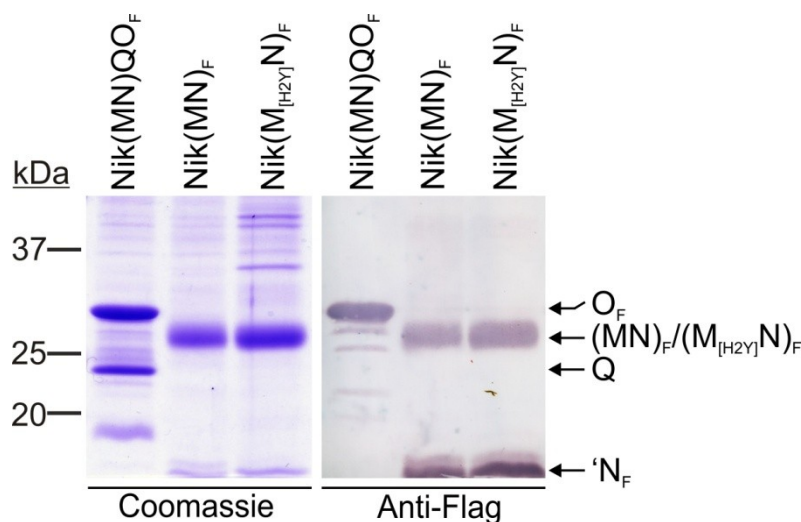


Abbildung 33: Elektrophoretische Auftrennung verschiedener Nickeltransporter-Komplexe. Die in *E. coli* rekombinant produzierten Komplexe Nik(MN)QO_F, Nik(MN)_F und Nik(M_[H2Y]N)_F wurden über den C-terminalen FLAG-tag an den Proteinen NikO, Nik(MN) bzw. Nik(M_[H2Y]N) gereinigt. Die Proteine wurden nach Tricin-SDS-PAGE durch Coomassiefärbung oder Western-Blot mit Anti-FLAG-Antikörpern nachgewiesen. Nik(MN) war nur locker mit dem Komplex assoziiert und wurde nicht kogereinigt. NikQ konnte durch seine Größe identifiziert werden. Nik(MN) und Nik(M_[H2Y]N) zeigten jeweils nur eine Laufform auf gleicher Höhe. In beiden Fällen wurde außerdem NikN ('N_F) vermutlich in der natürlichen Linkerregion proteolytisch vom NikM-Anteil getrennt.

Nik(MN) interagiert außerdem nur schwach mit NikQO und ging während der Reinigung des Holotransporters *Rc*Nik(MN)QO über NikO_F verloren. Bei dem mit NikO kogereinigten Protein handelte es sich aufgrund der Größe höchstwahrscheinlich um NikQ, während die 18 kDa-Bande vermutlich ein Abbauprodukt von NikQ oder NikO darstellte.

2.4 Der Oligomerzustand der T-Einheit BioN

Die gegenwärtig verfügbaren Strukturdaten für ECF-Holotransporter stammen von den folat-, pyridoxin- und pantothenat-spezifischen Systemen aus *L. brevis*, die in substrat- und nukleotidfreiem Zustand kristallisiert wurden und in der Einheitszelle in $A_1:A'_1:T_1:S_1$ -Stöchiometrie vorliegen (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Wie in Kapitel 2.1 dargelegt wurde, gibt es allerdings deutliche Hinweise auf oligomere Formen der S-Einheit und gleichermaßen wurden auch oligomere T-Komponenten beschrieben (Neubauer *et al.* 2011, Karpowich & Wang 2013). Bei affinitätschromatografischer Reinigung der His-getaggten T-Einheit aus *Thermotoga maritima* wurde eine zweite, FLAG-getaggte T-Einheit kogereinigt. Dies deutete auf eine Dimerisierung der T-Einheiten hin (Karpowich & Wang 2013). Chemische Vernetzungsexperimente zwischen *RcBioM* und *RcBioN* zeigten neben BioMN-Heterodimeren und BioM₂-Homodimeren auch zu einem geringen Anteil BioN₂-Homodimere. BioN dimerisierte über Disulfidbrücken, sofern jeweils ein Cystein in einem der C-terminal in den beiden Kopplungsregionen lokalisierten, konservierten ARS/ARG-Motiven oder in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen Motiven eingebracht wurde. Da im Gegensatz dazu das natürlich vorkommende Cystein 8 im N-terminalen, hydrophilen, cytoplasmatisch lokalisierten Loop nicht zur Vernetzung von BioN führte, konnte davon ausgegangen werden, dass die Homodimerisierung von BioN spezifisch durch die Ausbildung von Disulfidbrücken im Bereich der beiden Kopplungshelices erfolgte (Neubauer *et al.* 2011).

Zur Untersuchung der Dimerisierung von *RcBioN* ohne künstlich eingebrachte Cysteine wurde das schon für BioY genutzten „Pull-down“-Verfahren mittels Affinitätschromatografie genutzt. Die Dimerisierung von BioN wurde sowohl im BioMN- als auch im BioMNY-Komplex untersucht. Rekombinante *E. coli*-Zellen produzierten entweder nur C-terminal FLAG-getaggttes BioN (N_F) oder N_F zusammen mit Bio_HMN bzw. Bio_HMNY. Das tiefgestellte H deutet den N-terminalen His-tag an BioM an. Solubilisate der jeweiligen Membranen wurden an der Ni²⁺-NTA-Matrix chromatografiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung oder anschließendem Western-Blot mit entweder Anti-Oligo-His- oder Anti-FLAG-Antikörpern analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 zusammengefasst. Abbildung 34 A zeigt, dass (i) N_F erwartungsgemäß nicht an der Ni²⁺-NTA-Matrix binden konnte, aber (ii) in Gegenwart von Bio_HMN mit diesem koeluierte. Dieses Resultat war ein weiterer Hinweis auf oligomeres BioN. Die densitometrische Analyse der mit Coomassie gefärbten SDS-Gele ergab ein Verhältnis BioN_F:BioN von etwa 1:5. Demzufolge enthalten 20 % der Bio_HMN-Komplexe das zusätzliche BioN_F.

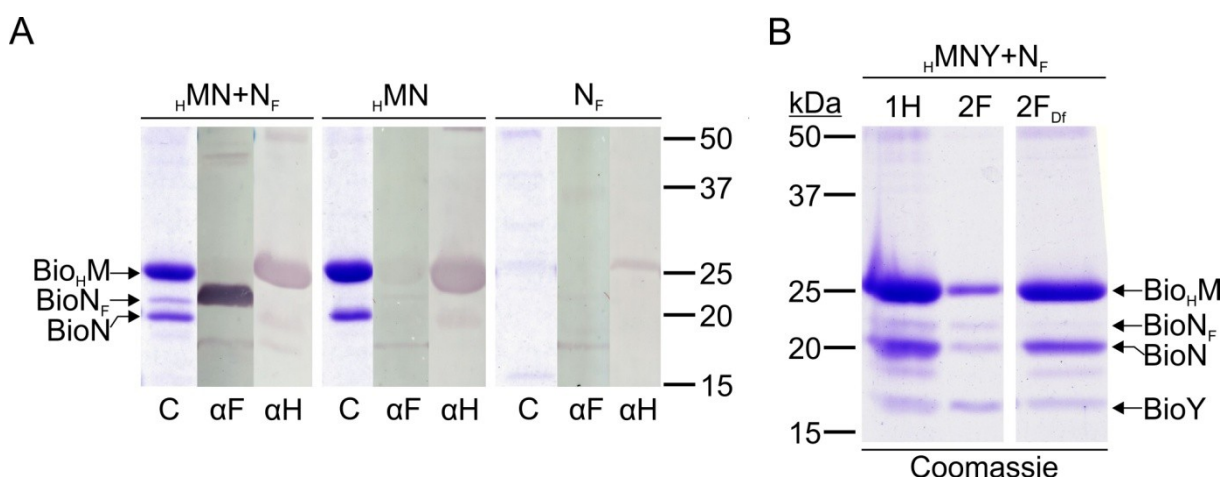


Abbildung 34: Koreinigung von FLAG-getaggtm BioN (N_F) mit dem His-getaggtm H_MN - oder H_MNY -Komplex. (A) Solubilisate mit H_MN plus N_F oder Solubilisate, die nur eines von beiden enthielten, wurden über Ni^{2+} -NTA chromatografiert. Die Eluate wurden nach SDS-PAGE mit Coomassiefärbung bzw. Western-Blot mit Anti-FLAG- (αF) oder Anti-Oligo-His-Antikörpern (αH) analysiert. Ungetaggtm $BioN$ lief tiefer als N_F und ist nur mittels Coomassiefärbung zu identifizieren. C: Coomassiefärbung. (B) Solubilisate mit H_MNY plus N_F wurden erst über die Ni^{2+} -NTA-Matrix (1H) und anschließend über die FLAG-spezifische Matrix (2F) chromatografiert. Zur Quantifizierung der $BioN_F$ - $BioN$ -Komplexe wurden in allen drei Spuren die gleichen Volumenanteile dessen analysiert, was auf die FLAG-spezifische Matrix gegeben wurde.

$BioN_F$ koeluierte auch mit dem Bio_HMNY -Holotransporter, was im mit Coomassie gefärbten SDS-Gel in Abbildung 34 B zu sehen ist. Bei Chromatografie über die Ni^{2+} -NTA-Matrix (1H) betrug das Verhältnis $BioN_F$: $BioN$ nach densitometrischer Analyse erneut etwa 1:5. 17 % des Bio_HMNY -Komplexes enthielten das zusätzliche $BioN_F$. Das über die Ni^{2+} -NTA-Matrix erhaltene Eluat wurde anschließend über die FLAG-spezifische Matrix chromatografiert (2F), um die spezifische Dimerisierung zu verifizieren. Für die vergleichende Quantifizierung der $BioN$ -Anteile nach beiden Chromatografieschritten wurden die aufgetragenen Volumina der Proben so gewählt, dass unter Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen Auftragsvolumen vor Chromatografie 2 und Endvolumen des filtrierten und umgepufferten Eluats Aliquot 1H und 2F einander entsprachen. Für das Aliquot 2F_{Df}, welches den Durchfluss während Chromatografie 2 enthielt, wurde das Volumen auf die gleiche Weise eingestellt.

Konkret wurden 2,2 ml des Ni^{2+} -NTA-Eluats an der FLAG-spezifischen Matrix chromatografiert und der Durchfluss wurde dabei aufgefangen. Je 100 μl des 2F_{Df}-Durchflusses sowie des 1H-Eluats wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 1/6 davon wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Spuren des mit Coomassie gefärbten SDS-Gels in Abbildung 34 B enthielten somit 1/132 dessen, was auf die FLAG-Matrix gegeben wurde. Das Eluat nach Chromatografie 2 wurde umgepuffert und auf etwa 500 μl konzentriert. 1/5 davon, also 100 μl , wurden mit 20 μl SDS-Probenpuffer versetzt und 4,5 μl wurden mittels SDS-

PAGE in Spur 2F analysiert, was wiederum einer Menge von 1/132 dessen entsprach, was ursprünglich auf die FLAG-Matrix gegeben wurde.

Nach dem zweiten Chromatografieschritt über die FLAG-spezifische Matrix konnte nach densitometrischer Analyse ein Verhältnis $\text{BioN}_F:\text{BioN}$ von 1:1,5 bestimmt werden. Die Veränderung des Verhältnisses von 1:5 (1H) zu 1:1,5 (1F) erhärtete den Verdacht, dass die beobachtete Dimerisierung von BioN in 20 % der Holotransporter spezifisch war. Die densitometrische Analyse der Bandenstärke von BioY ergab ein Verhältnis $\text{BioN}_F:\text{BioY}$ von 1:2,7 und deutet somit auch auf oligomerisiertes BioY hin. Beim Vergleich der Bandenstärke von BioN_F zu BioM ergab sich ein Verhältnis von 1:7. Da cytoplasmatische Proteine durch Coomassie stärker angefärbt werden als membranständige Proteine, war das Verhältnis von BioM zu BioN_F vermutlich etwas geringer als es durch die densitometrische Analyse bestimmt wurde. Für den gereinigten Komplex ergab sich rein rechnerisch ein Verhältnis von $\text{BioM}:\text{BioN}:\text{BioN}_F:\text{BioY}$ von 7:1,5:1:2,7. Wird die verstärkte Anfärbung von BioM durch Coomassie berücksichtigt, kann für den gereinigten Komplex insgesamt sowohl eine Stöchiometrie von 4:1:1:2 als auch von 2:1:1:2 ($\text{M}:\text{N}:\text{N}_F:\text{Y}$) angenommen werden.

3. Diskussion

3.1 Struktur der ECF-Transporter und Funktion der S- und T-Untereinheiten

Die ECF-Transporter setzen sich wie alle ABC-Transporter aus zwei TMD und zwei NBD zusammen. Die zwei NBD – die A-Einheiten – stellen als Homo- oder Heterodimere die Energie für den Transportvorgang durch ATP-Hydrolyse bereit (Slotboom 2014, Karpowich & Wang 2013, Chai *et al.* 2013, Rice *et al.* 2014a, ter Beek *et al.* 2014). Im Unterschied zu ABC-Exportern und kanonischen ABC-Importern mit symmetrischen oder pseudosymmetrischen TMD (ter Beek *et al.* 2014) weisen die ECF-Transporter mit der T-Einheit und der S-Einheit heterodimere TMD auf, die funktionell und strukturell verschieden voneinander sind. Die S-Einheiten sind kleine Transmembranproteine mit sechs bzw. sieben Transmembranhelices und vermitteln die Substratspezifität (Eitinger *et al.* 2011). Alle bisher kristallisierten S-Einheiten zeigen trotz der für diese Proteine typischen geringen Sequenzähnlichkeiten von nur 10-20 % eine konservierte globale Struktur (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014, Yu *et al.* 2014).

Die T-Einheit koppelt die durch ATP-Bindung und nach ATP-Hydrolyse induzierten Konformationsänderungen der A-Einheiten mit dem Substrattransport. Zwei cytoplasmatische Helices der T-Einheit – auch Kopplungshelices genannt – enthalten jeweils ein kurzes, konserviertes XRX-Motiv. Diese beiden Motive stellen die Kontaktstellen zwischen der T-Einheit und den A-Einheiten dar (Neubauer *et al.* 2009, Neubauer *et al.* 2011, Slotboom 2014). Die Bedeutung dieser Motive und insbesondere des konservierten zentralen Argininrests wurde experimentell durch Aminosäureaustausche in beiden Motiven aufgezeigt. Für die veränderten Transportervarianten wurden stark reduzierte ATPase-Aktivitäten, vollständige Transportdefizienz oder instabile Transportkomplexe beobachtet (Neubauer *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2014). Der direkte Kontakt der T-Einheit über die XRX-Motive mit den A-Einheiten wurde durch chemische Vernetzungsexperimente nachgewiesen (Neubauer *et al.* 2011). Die experimentellen Befunde bestätigten sich nach Analyse der gegenwärtig verfügbaren Kristallstrukturen dreier ECF-Holotransporter aus *L. brevis*, die jeweils aus dem gleichen ECF-Modul sowie einer der drei S-Einheiten FolT, PdxU oder PanT bestehen. Die Strukturen sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Struktur von *LbEcfT* besteht aus acht Helices, wovon fünf die Membran durchspannen und drei cytoplasmatisch orientiert sind (Xu *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Die cytoplasmatischen Helices CH2 und CH3 der T-Einheit stellen die Kopplungshelices dar und interagieren über die XRX-Motive jeweils mit dem Q-Loop einer der beiden A-Einheiten. Die Kristallstrukturen zeigten, dass die

Kopplungshelices auch mit der S-Einheit interagieren, wodurch die T-Einheit den Transportkomplex stabilisiert (Xu *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014).

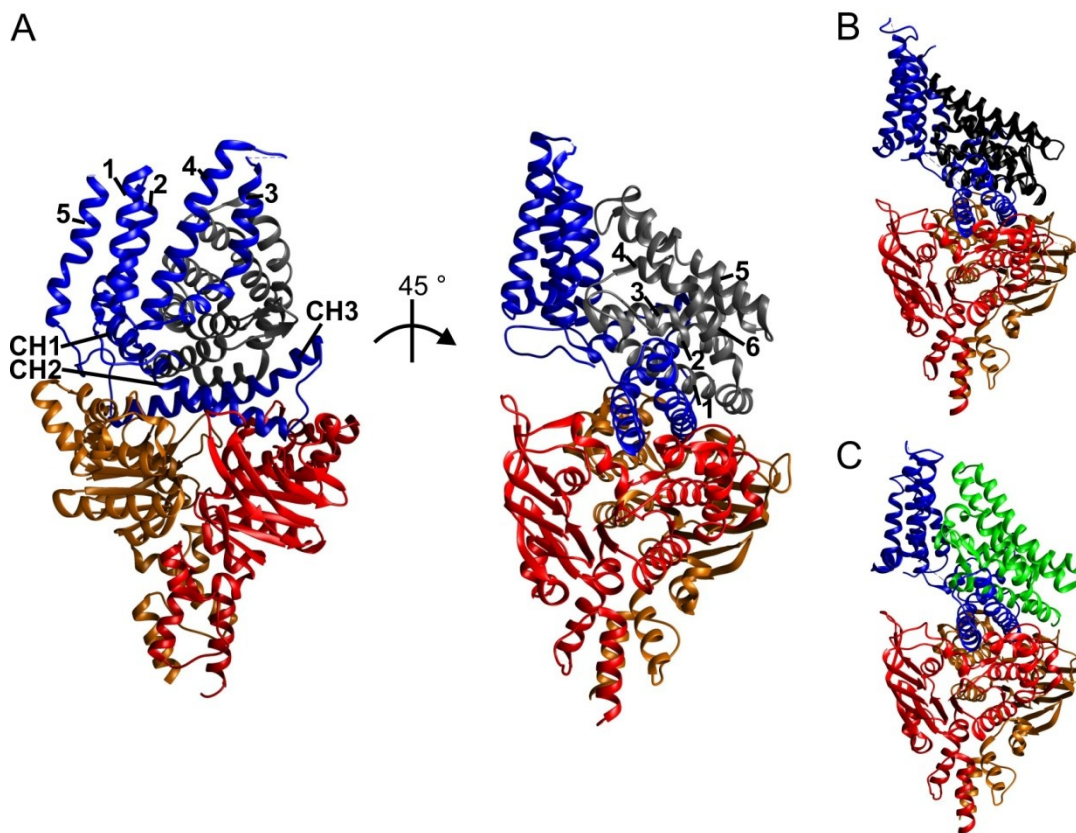


Abbildung 35: Strukturen der ECF-Holotransporter aus *L. brevis*. Das Energetisierungsmodul – bestehend aus EcfA (rot), EcfA' (orange) und EcfT (blau) – interagiert mit (A) FolT (grau), (B) PdxU (schwarz) oder (C) PanT (grün). Die Transmembranhelices 1-5 der T-Einheit, die cytoplasmatischen Kopplungshelices CH2 und CH3 sowie die verbindende cytoplasmatische Helix CH1 sind links in A nummeriert. Die Transmembranhelices der S-Einheit FolT sind rechts in A nummeriert. Die Abbildungen wurden mit Chimera 1.7 nach PDB 4huq (A), 4hzu (B) und 4rfs (C) erstellt.

In den drei Kristallstrukturen der ECF-Holotransporter ist erkennbar, dass die S-Einheiten *LbPdxU*, *LbPanT* bzw. *LbFolT* jeweils quer zur T-Einheit orientiert sind. Dadurch ist die unbeladene Substratbindestelle nahe der cytoplasmatischen Seite des Proteins lokalisiert und die hydrophilen Loops 1, 3 und 5 der S-Einheiten befinden sich innerhalb der hydrophoben Membran. Energetisch ungünstige Effekte innerhalb der Membran werden vermieden, indem die T-Einheit die drei hydrophilen Loops der S-Einheiten völlig umschließt. Die drei cytoplasmatischen Helices der T-Einheit sind senkrecht zu den Transmembranhelices 1 bis 5 angeordnet, wodurch sich eine „L“- bzw. „C“-Form der T-Einheit ergibt, in welche die S-Einheiten mit den Loops 1, 3 und 5 hineinragen. Besonders die Loops 3 und 5 der S-Einheiten interagieren jeweils mit den Transmembranhelices 1, 3 und 4 der T-Einheit. Die Kopplungshelices der T-Einheit interagieren mit der Transmembranhelix 1 der S-Einheiten

(Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Für die Interaktion sind hydrophobe, kleine Aminosäuren wie Alanin oder Valin in der ersten Transmembranhelix der S-Einheiten essentiell (Kiesler 2013, Erkens *et al.* 2011). Ein intensiver Kontakt der zweiten Kopplungshelix der T-Einheit erfolgt mit einer hydrophoben Furche, welche in allen bisher kristallisierten S-Einheiten in der Proteinoberfläche identifiziert wurde. Diese Furche wird durch die Transmembranhelix 2 und den Loop 1 gebildet und von Transmembranhelix 1 und dem C-terminalen Bereich der Transmembranhelix 6 begrenzt (Zhang *et al.* 2014). Es wird vermutet, dass im Falle der ECF-Transporter der Subklasse II dieser hydrophobe Interaktionsbereich eine Rolle bei der Interaktion einer T-Einheit mit den verschiedenen S-Einheiten spielt (Slotboom 2014).

Für die einzeln kristallisierten, vitaminspezifischen S-Einheiten *SaRibU*, *L/ThiT* und *L/BioY* wurde eine aufrechte Position in der Membran angenommen (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012). Diese Annahme beruht darauf, dass sich nach der *positive-inside*-Regel cytoplasmatisch lokalisierte Loops durch ein größeres Vorkommen an positiv geladenen Aminosäuren auszeichnen (von Heijne 1989, von Heijne 2006). Eine aufrechte Position der S-Einheiten mit eindeutig periplasmatisch bzw. cytoplasmatisch lokalisierten Loops würde dieser Regel entsprechen (Slotboom 2014). Die beladene Substratbindestelle der S-Einheiten wäre in der angenommenen, aufrechten Position des Proteins somit nahe der extrazellulären Seite des Proteins lokalisiert (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012). Ein für die ECF-Holotransporter entwickeltes hypothetisches Transportmodell postuliert, dass durch die Bindung von ATP an die A-Einheit und die Übertragung der resultierenden Konformationsänderungen mittels der T-Einheit die S-Einheit von der quer zur T-Einheit orientierten Position in die aufrechte, zur T-Einheit parallele Position wechselt (Slotboom 2014, Zhang 2013). Neuere Untersuchungen lassen eine so weit aufgerichtete Orientierung der S-Einheiten im Holotransporter fragwürdig erscheinen, da auch nach ATP-Zugabe chemische Vernetzungen zwischen der ersten Transmembranhelix der S-Einheit und der Kopplungshelix CH2 der T-Einheit im biotinspezifischen Holotransporter BioMNY erhalten blieben (Ogienko 2014). Es gibt zwar Hinweise, dass CH2 relativ weit in die Membran hineinragen könnte, um einen weiteren Kontakt mit der S-Einheit zu ermöglichen (Finkenwirth *et al.* 2015), aber die Position der S-Einheiten wird vermutlich nicht der angenommenen, senkrechten Position des postulierten, substratbeladenen Zustandes der Holotransporter entsprechen. Die Klärung der Orientierung der substratbeladenen S-Einheiten in den Holotransportern bedarf weiterführender Untersuchungen, die die Kristallisation substrat-/nukleotidbeladener Komplexe und die EPR-Analyse doppelt spinmarkierter Komplexe beinhalten könnten.

3.2 Die Transportaktivität von S-Einheiten in Abwesenheit eines ECF-Moduls

Mehrere Untersuchungen von ECF-Transportern der Subklasse II zeigten, dass nur der vollständige und intakte Holotransporter zur Vitaminaufnahme in die Zellen befähigt ist (Neubauer *et al.* 2009, Rodionov *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Karpowich & Wang 2013, Zhang *et al.* 2014). Im Gegensatz dazu wurde aufgrund der Akkumulation radioaktiver Substrate in *E. coli*-Zellen, welche nur *RcBioY*, *CbiMN* aus *S. Typhimurium* bzw. *R. capsulatus* oder *RcNik(MN)* enthielten (Hebbeln *et al.* 2007, Rodionov *et al.* 2006, Siche *et al.* 2010, Kirsch & Eitinger 2014), die Schlussfolgerung gezogen, dass diese der Subklasse I angehörenden S-Einheiten auch ohne A- und T-Einheiten Transportaktivität besitzen. Im Falle der metallspezifischen S-Einheiten war jedoch die Anwesenheit der jeweiligen N-Komponente essentiell (Rodionov *et al.* 2006, Siche *et al.* 2010, Kirsch & Eitinger 2014). Da als Untersuchungssystem *E. coli*-Stämme genutzt wurden, welche keine Komponenten eines ECF-Transporters besitzen, konnte eine unspezifische Interaktion der S-Einheiten mit anderen ECF-Modulen ausgeschlossen werden.

Neben *RcBioY* wurde für weitere BioY-Proteine der Subklasse I (*AtBioY*, *SmBioY*) aufgrund der Akkumulation radioaktiv markierten Biotins in *E. coli*-Zellen (Kirsch *et al.* 2012) auf die Transportfunktion ohne ECF-Modul geschlossen. Ebenso wurde geschlussfolgert, dass BioY-Proteine aus Organismen, welche keine für die T-Einheit codierenden Gene enthalten, allein Biotin transportieren, da acht der solitär vorkommenden BioY-Proteine aus sechs verschiedenen Organismen (Kirsch *et al.* 2012) sowie solitäres BioY aus *Chlamydia trachomatis* 434/Bu (*CtBioY*) (Fisher *et al.* 2012) die Akkumulation radioaktiv markierten Biotins in *E. coli*-Zellen vermittelten. Darüber hinaus zeigten jedoch auch Zellen mit BioY-Proteinen der Subklasse II (*L/BioY1*, *L/BioY2*) zellassoziierte Radioaktivität nach Inkubation mit radioaktiv markiertem Biotin. Nachdem bei Rekonstitution von gereinigtem *RcBioY* und *L/BioY* in Proteoliposomen für beide BioY-Proteine kein Transport, sondern nur eine hochaffine Bindung des Substrats (*L/BioY1*-K_D: 0,3 nM) festgestellt werden konnte (Berntsson *et al.* 2012), stellte sich die Frage, inwieweit die Akkumulation radioaktiv markierter Substrate in den Zellen tatsächlich Aufnahme des Substrats in die Zelle oder nur hochaffine Substratbindung an die S-Einheit in der Zellmembran widerspiegelte. Nach Berntsson *et al.* (2012) könnte die bei kinetischen Experimenten mit *RcBioY* bzw. *CtBioY* enthaltenden Zellen beobachtete Akkumulation radioaktiv markierten Biotins mit einer maximalen Geschwindigkeit von 55-60 pmol x min⁻¹ x mg⁻¹ (Hebbeln *et al.* 2007, Fisher *et al.* 2012) als Austausch von bereits gebundenem, unmarkiertem Biotin gegen markiertes Biotin interpretiert werden. Das an BioY gebundene Biotin könnte mit einer langsamen *Off*-Kinetik,

die sich im Falle von RcBioY in Proteoliposomen im Minutenbereich bewegte (Berntsson *et al.* 2012), vom Protein dissoziieren. Die Bindung des Biotins an BioY erfolgt aufgrund der für verschiedenste S-Einheiten nachgewiesenen hohen Substrataffinität mit Dissoziationskonstanten im nano- bis subnanomolaren Bereich (Duurkens *et al.* 2007, Erkens & Slotboom 2010, Berntsson *et al.* 2012) innerhalb von Sekundenbruchteilen (Berntsson *et al.* 2012). Auch die in der vorliegenden Arbeit bei kinetischen Analysen von RcBioY produzierenden Zellen beobachtete zurückgebliebene, zellassozierte Radioaktivität könnte ein Resultat der langsamen *Off*- und schnellen *On*-Kinetik des Biotinaustauschs an BioY sein.

Die Klärung der Frage, ob BioY ausschließlich Substrat bindet oder auch in die Zellen transportiert, ist besonders wichtig, um zu verstehen, wie Organismen mit solitärem BioY aber ohne die Fähigkeit zur Biotinsynthese zum Überleben befähigt sind. Beispiele für derartige Organismen sind einige Chlamydien, α -Proteobakterien oder Aktinobakterien (Hebbeln *et al.* 2007, Rodionov *et al.* 2002).

Für acht solitär vorkommende BioY-Proteine wurde die Transportfunktion ohne ECF-Modul bestätigt, indem das Wachstum eines biotinauxotrophen und je eines der verschiedenen BioY-Proteine produzierenden *E. coli*-Stamms in Minimalmedium mit definierter, minimaler Biotinkonzentration nachgewiesen wurde (diese Arbeit und Finkenwirth *et al.* 2013).

Die Ergebnisse schließen nicht aus, dass eine signifikante Menge Biotin an BioY gebunden verblieb. Die langsame *Off*-Kinetik der Biotindissoziation von BioY könnte dazu führen, dass die geringe, aber für das Wachstum ausreichende Transportrate *in vitro* durch die Biotinbindung überlagert wird und somit schwer messbar ist. Selbst eine schwache Transportrate der solitär vorkommenden BioY-Proteine reicht jedoch aus, um den Bedarf der Zellen von 100-200 Molekülen Biotin pro Zelle (Choi-Rhee & Cronan 2005) zu decken. Biotin ist zwar essentiell für die Fettsäuresynthese, wird aber in *E. coli* nur als Kofaktor für ein Enzym, die Acetyl-CoA-Carboxylase, benötigt (Tong 2013).

Auch der Bedarf der Zellen an durch die metallspezifischen S-Einheiten transportiertem Nickel und Kobalt ist gering. Beide sind ebenfalls essentielle Kofaktoren für zelluläre Enzyme, aber die Konzentration in der Zelle muss stark reguliert werden, um toxische Effekte zu verhindern (Macomber & Hausinger 2011). Daher ist auch für Nickel und Kobalt eine extrem geringe Transportrate ausreichend für das Wachstum. Für die metallspezifischen S-Einheiten konnte durch die Analyse der Aktivität der zellulären, nickelabhängigen Urease die Transportfunktion von RcCbiMN und RcNik(MN) bestätigt werden (Kirsch & Eitinger 2014).

Für BioY-Proteine der Subklassen I (RcBioY) und II (L/BioY1 und L/BioY2) konnte nicht abschließend geklärt werden, ob sie allein ohne Energetisierungsmodul Transportfähigkeit besitzen. Das Wachstum der Zellen, welche RcBioY, L/BioY1 oder L/BioY2 produzierten, war

zum einen bei einer Biotinkonzentration von 1 nM gestört, bei der Zellen mit solitären BioY-Proteinen bzw. mit dem Holotransporter *RcBioMNY* wachsen konnten. Zum anderen wuchsen Zellen mit *RcBioY* bei höheren Biotinkonzentrationen von 10 nM bis 100 nM (Finkenwirth 2013, Projektstudie) und Zellen mit *L/BioY1* bzw. *L/BioY2* bei 1 μ M Biotin im Medium nicht in dem Maße, wie Zellen ohne ECF-Komponenten aufgrund des Biotinimports durch einen unbekannten, alternativen Biotintransporter (Finkenwirth *et al.* 2013). Die Hemmung des Wachstums bei höheren Biotinkonzentrationen deutete auf einen möglicherweise durch Membranstress aufgrund von Biotinmangel bedingten negativen Effekt hin, der auch den Import von Biotin durch den alternativen, unbekannten Transporter verhinderte. Dieser unbekannte Effekt könnte das Wachstum bei allen untersuchten Biotinkonzentrationen beeinflussen, da eine nicht an die der solitären BioY-Proteine heranreichende Transportrate von *RcBioY*, *L/BioY1* bzw. *L/BioY2* für die Kompensation dieses Effekts nicht ausreichend sein könnte.

3.3 Wie ist die Transportfunktion von BioY erklärbar?

3.3.1 Die verschiedenen Mechanismen des *alternating-access*-Modells

Ein Vergleich der nach der Kristallstruktur von *L/BioY1* (PDB: 4dve) modellierten Strukturmodelle aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten BioY-Proteine zeigt, dass die BioY-Proteine bei Sequenzidentitäten von 19 bis maximal 34 % eine sehr ähnliche Topologie mit r.m.s.d.-Werten zwischen 0,4 und 1,2 Å bei 175 verglichenen Ca-Atomen aufweisen. Aufgrund der vergleichbaren Topologie nutzen die verschiedenen BioY-Proteine für den Substrattransport über die Membran höchstwahrscheinlich alle den gleichen Mechanismus, auch wenn die Transportkapazität teilweise nicht für das Wachstum der Zellen des biotindefizienten Indikatorstamms ausreichte.

Eine essentielle Voraussetzung für den Substrattransport ist auch bei so kleinen Proteinen wie den S-Einheiten mit molekularen Massen von circa 21 kDa und nur sechs bzw. sieben Transmembranhelices, dass die Substratbindestelle nicht gleichzeitig von der extrazellulären und der cytoplasmatischen Seite aus zugänglich ist. Entsprechend des *alternating-access*-Modells wird der Zugang zur Substratbindestelle durch Konformationsänderungen der beteiligten Transportproteine alternierend reguliert (Slotboom 2014, Tanford 1982). Auslöser für Konformationsänderungen können beispielsweise wie im Falle der ABC-Transporter die Bindung von ATP und die Dissoziation von ADP nach ATP-Hydrolyse sein.

Sehr gut charakterisierte Vertreter der kanonischen ABC-Importer I und II in *E. coli* sind der Maltose/Maltodextrintransporter MalEFGK₂ als Vertreter der Importer I und der Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂F als Vertreter der Importer II. Für beide existieren Kristallstrukturen unterschiedlicher Transportstadien (ter Beek *et al.* 2014). Obwohl in beiden Fällen die ATP-Bindung die Konformationsänderungen bewirkt, zeigt der Vergleich in Abbildung 36, dass signifikante Unterschiede zwischen beiden Translokationsvorgängen zu beobachten sind. Die Importer I weisen in Abwesenheit von ATP nach innen geöffnete TMD auf. Die Importer II bilden in Abwesenheit von ATP hingegen einen auswärts geöffneten Zustand aus (ter Beek *et al.* 2014, Locher *et al.* 2002, Woo *et al.* 2012, Noinaj & Buchanan 2014). Die NBD sind im Bereich zwischen Signatur-Motiv und Walker A-Motiv zwischen 14 und 18 Å voneinander entfernt (Moussatova *et al.* 2008). Im Falle der Importer I bewirkt die Bindung des substratbeladenen SBP an die TMD eine Konformationsänderung der TMD, die sich über die Kopplungshelices der TMD und die Q-Loops der NBD auf die NBD überträgt. Die NBD nähern sich einander an, wodurch ATP gebunden und eine geschlossene Konformation der NBD ausgebildet wird. Die Konformationsänderung der NBD bewirkt wiederum die Öffnung der TMD nach außen. Der cytoplasmatische Zugang wird durch ein von den TMD gebildetes Tor verschlossen. Das SBP verschließt den extrazellulären Zugang und das Substrat gelangt bis in den zentralen Bereich zwischen den TMD. Die Importer II besitzen nur eine geringe Affinität für ein substratbeladenes SBP, da die Substratbindung entweder eine höhere Dissoziationsrate des SBP vom Komplex oder eine schwächere Assoziationsrate an den Komplex bewirkt (Rice *et al.* 2014a, Vigonsky *et al.* 2013). Der auf beiden Seiten durch die TMD verschlossene Komplex bildet sich, wenn das substratbeladene SBP an die TMD sowie ATP an die NBD bindet. Das Substrat wird dabei in den Bereich zwischen den TMD freigesetzt. Aufgrund der teilweise sehr großen Substrate der Importer II kann dieser Bereich ein Volumen von bis zu 3400 Å³ aufweisen, wie für BtuC₂D₂F berechnet wurde (Rice *et al.* 2014a). Die ATP-Hydrolyse initiiert bei beiden Transportern die Konformationsänderung der NBD zurück zum geöffneten Zustand. Diese Bewegung überträgt sich auf die TMD, welche eine nach innen offene Konformation einnehmen. Das geschlossene, periplasmatische Tor wird bei MalG/MalF durch Loops mit hydrophoben Aminosäuren gebildet (Khare *et al.* 2009). Das Substrat gelangt durch den Kanal zwischen den TMD nach innen in das Cytoplasma (ter Beek *et al.* 2014, Rice *et al.* 2014a, Schneider *et al.* 2012, Bordignon *et al.* 2010). Im Falle der Importer II bewirkt die Konformationsänderung der TMD BtuC₂, dass das Substrat durch die Transmembranhelix 5 aus dem Protein hinaus ins Cytoplasma geschoben wird (ter Beek *et al.* 2014, Rice *et al.* 2014a, Korkhov *et al.* 2014, Korkhov *et al.* 2012).

Die Importer II zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu den meisten Importern I im nukleotidfreien Zustand mit dem substratfreien SBP interagieren (Rice *et al.* 2014a). Das auch im substratfreien Zustand mit dem Maltosetransporter-Komplex verbundene SBP MalE stellt bei den Importern I eine Ausnahme dar (Böhm *et al.* 2013).

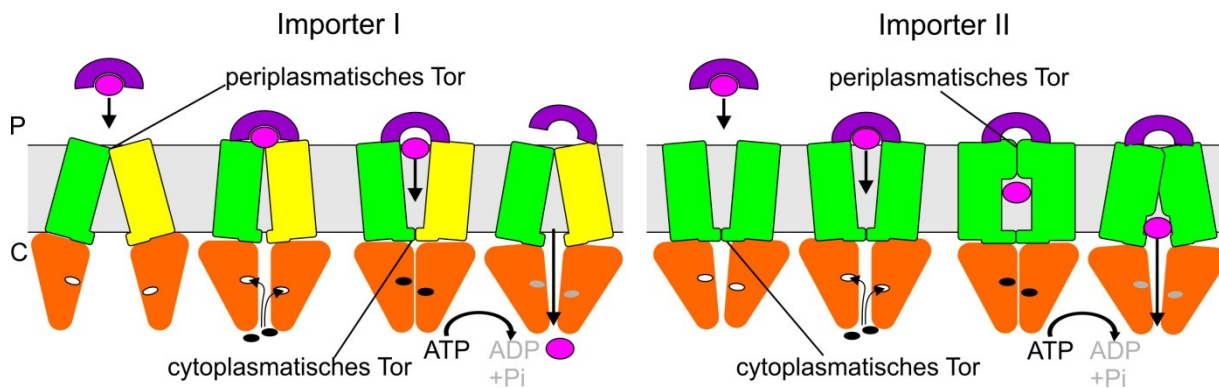


Abbildung 36: Transportmechanismus kanonischer ABC-Importer. Die Importer I sind durch den Maltose/Maltodextrintransporter MalEFGK₂ vertreten, die Importer II durch den Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂F; beide aus *E. coli*. Das Substrat (rosa) wird transportiert, indem TMD und NBD nach Bindung des SBP (MalE, BtuF: lila) sowie nach Bindung und Hydrolyse von ATP (schwarz) ihre Konformationen ändern. Die cytoplasmatischen und hydrophoben bzw. periplasmatischen Tore regulieren den alternierenden Zugang zwischen Periplasma (P) und Cytoplasma (C). Die dargestellten Transporter besitzen heteodimere (MalF: grün, MalG: gelb) bzw. homodimere TMD (BtuC₂: grün); beide besitzen homodimere NBD (MalK₂, BtuD₂: orange).

Die Unterschiede zwischen den Transportmechanismen anderer Transporter und den soeben beschriebenen Mechanismus der kanonischen ABC-Importer sind noch stärker als die Unterschiede der Mechanismus der kanonischen Importer I und II untereinander. Bisher wurden die verschiedenen Mechanismen zur Vereinfachung auf drei Modelle reduziert (Slotboom 2014), welche in Abbildung 37 A dargestellt sind. Beim *rocker-switch*-Mechanismus führt ein Kanal innerhalb des Proteins, der alternativ auch an der Grenzfläche zwischen beteiligten TMD gebildet werden kann, bis zu einer zentral innerhalb des Proteins gelegenen Substratbindestelle. Nach einer Drehbewegung der Proteindomänen an einer „Achse“ nahe der Substratbindestelle schließt sich der bisher offene Kanal und es öffnet sich alternierend dazu ein Kanal zur entgegengesetzten Membranseite (Abramson *et al.* 2003, Boudker & Verdon 2010). Beim *gated-pore*-Mechanismus regulieren zwei „Tore“ den Zugang zur Substratbindestelle, welche ebenfalls zentral innerhalb des Proteins lokalisiert ist. Es können nicht beide „Tore“ gleichzeitig geöffnet sein, aber es existiert ein Zwischenzustand des Proteins, bei dem beide „Tore“ geschlossen sind (Forrest & Rudnick 2009, Boudker & Verdon 2010). Beim *elevator*-Mechanismus werden eine bewegliche Transportdomäne und eine feststehende Helferdomäne benötigt. Die Substratbindestelle ist ebenfalls durch zwei „Tore“

alternierend zugänglich und befindet sich in der Transportdomäne. Während des geschlossenen Zwischenzustands ändert die Transportdomäne durch Konformationsänderungen ihre Position in Bezug auf die Helferdomäne. Dadurch ändert sich während des Transportvorgangs die Position des Substrats innerhalb des Proteins (Reyes *et al.* 2009), wohingegen die Position des Substrats in den beiden anderen Mechanismen nach der Bindung an die Substratbindestelle während der Bewegung der Proteindomänen gleich bleibt (Slotboom 2014). Die kanonischen ABC-Importer nutzen den *gated-pore*-Mechanismus (Slotboom 2014, ter Beek *et al.* 2014, Rice *et al.* 2014a), während der Mechanismus der ABC-Exporter eher den *rocker-switch*-Mechanismus widerspiegelt (Hohl *et al.* 2012, ter Beek *et al.* 2014).

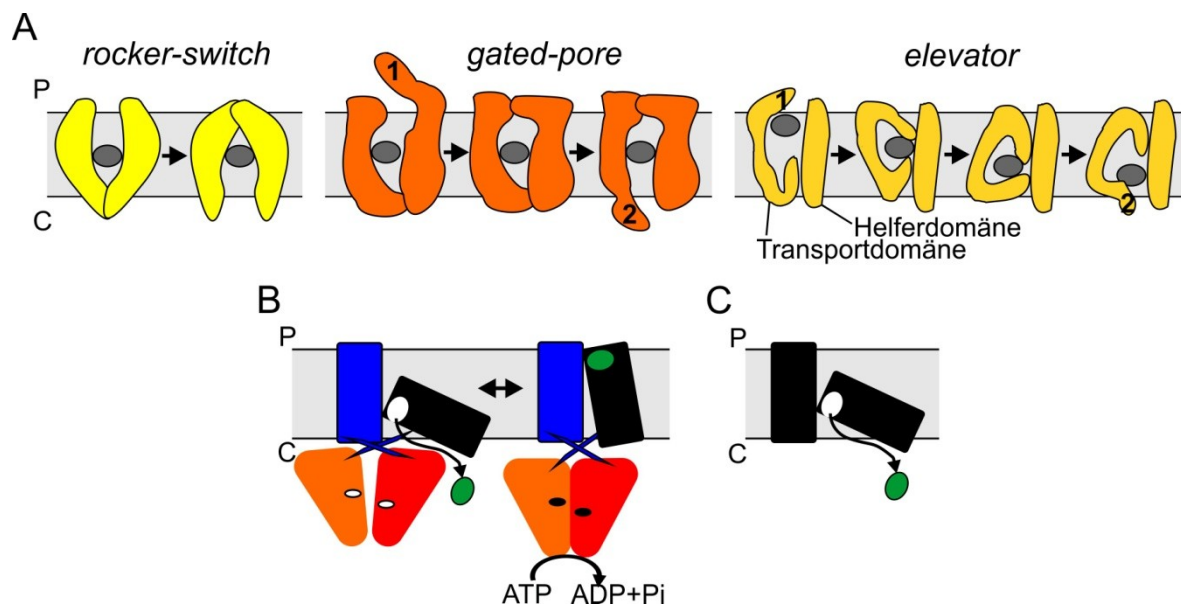


Abbildung 37: Die verschiedenen Transportmechanismen des *alternating-access*-Modells. In (A) sind *rocker-switch*-, *gated-pore*- und *elevator*-Mechanismus dargestellt. Das Substrat gelangt beim *gated-pore*- und beim *elevator*-Mechanismus durch das „Tor“ 1 zur Substratbindestelle und durch das „Tor“ 2 in das Cytoplasma. Beim *elevator*-Mechanismus enthält die Transportdomäne beide „Tore“ und die Substratbindestelle. Die Konformationsänderung der Transportdomäne wird durch eine unbewegliche Helferdomäne unterstützt. Das Substrat ist als graue Ellipse dargestellt. (B) Dargestellt ist der hypothetische Transportmechanismus der ECF-Holotransporter. Links: T-Einheit (blau), substratfreie S-Einheit (schwarz) und nukleotidfreie A-Einheiten A (rot) und A' (orange), basierend auf den drei verfügbaren Kristallstrukturen der ECF-Holotransporter (PDB: 4huq, 4hzu, 4rfs). Rechts: Der hypothetische substrat- und nukleotidbeladene Zustand mit aufgerichteter S- und geschlossenen A-Einheiten. Die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Substrattransport erfolgt durch die Kopplungshelices der T-Einheit, dargestellt als blaue, sich kreuzende Balken. (C) Eine Dimerisierung der S-Einheiten könnte in Abwesenheit des ECF-Moduls den Transport von Substrat (grün) ermöglichen. P: Periplasma, C: Cytoplasma.

Im Einklang mit den drei zuvor beschriebenen Transportmechanismen besitzen auch die S-Einheiten der ECF-Transporter mit dem Loop 1 ein „Tor“ zur Regulation des Zugangs zur Substratbindestelle. Obwohl die Auflösungen insbesondere der drei Kristallstrukturen der Holotransporter mit 3-3,5 Å nur von mittlerer Qualität sind und die Elektronendichten der Loopregionen teilweise keine Aussagen auf atomarer Ebene zulassen (Slotboom 2014), konnte gezeigt werden, dass der Loop 1 im Falle der einzeln kristallisierten, substratbeladenen S-Einheiten die Substratbindestelle deckelartig verschließt (Zhang 2013, Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012). Dagegen ist im Falle der substratfrei vorliegenden S-Einheiten im Holotransporter die Position des Loop 1 soweit verändert, dass die Substratbindestelle offen zugänglich ist (Zhang 2013, Xu *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014).

Die Translokation des Substrats erfolgt im Falle der ECF-Transporter jedoch weder durch einen Kanal zwischen den beiden strukturell und funktionell unterschiedlichen TMD noch durch einen Kanal im Zentrum der S-Einheiten (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014, Yu *et al.* 2014, Majsnerowska *et al.* 2013). Für die ECF-Holotransporter wurde ein vierter Transportmechanismus postuliert, der in Abbildung 37 B dargestellt ist. Der alternierende Zugang zur Substratbindestelle entweder aus dem Cytoplasma oder aus dem Periplasma wird demnach gewährleistet, indem die S-Einheit von einer quer zur T-Einheit orientierten Position in eine aufrechte Position wechselt, wie sie für die einzeln kristallisierten, substratbeladenen S-Einheiten angenommen wurde (Zhang 2013, Slotboom 2014). Im nukleotidfreien Zustand sind die A-Einheiten geöffnet und der Abstand zwischen dem Signatur-Motiv und dem Walker A-Motiv der beiden A-Einheiten beträgt 15 Å (Karpowich & Wang 2013). Die Bindung von ATP bewirkt die Konformationsänderung der NBD zum geschlossenen Zustand. Diese Bewegung überträgt sich höchstwahrscheinlich über den Q-Loop auf die Kopplungshelices der T-Einheit, wie dies analog bei den NBD und TMD der kanonischen ABC-Importer beobachtet wurde. Durch die hydrophoben Interaktionen der Kopplungshelices der T-Einheit mit der hydrophoben Furche sowie der ersten Transmembranhelix der S-Einheit (Zhang *et al.* 2014) könnte die scherenartige Konformationsänderung der Kopplungshelices das Aufrichten der S-Einheit im Komplex bewirken (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013). Obwohl chemische Vernetzungsexperimente vermuten lassen, dass die S-Einheit sich nicht vollständig vertikal aufrichtet (Ogienko 2014), kann angenommen werden, dass sich die Orientierung der S-Einheit mindestens soweit ändert, dass die Substratbindestelle periplasmatisch zugänglich wird und Substrat gebunden werden kann. Nach ATP-Hydrolyse und Dissoziation von ADP bewirkt das Öffnen der A-Einheiten vermutlich das Kippen der S-Einheit in den in der

Kristallstruktur beobachteten Ausgangszustand, wodurch die Substratbindestelle nahe des Cytoplasmas lokalisiert ist und das Substrat vorbei am geöffneten Loop 1 in die Zelle gelangen kann (Zhang 2013, Slotboom 2014, ter Beek *et al.* 2014, Rice *et al.* 2014a). Die bisher hypothetischen Konformationsänderungen der einzelnen Untereinheiten der ECF-Transporter nach ATP-Bindung und -Hydrolyse bedürfen noch der experimentellen Verifizierung. Sicher ist hingegen, dass die Bindung und Dissoziation von ATP bzw. ADP essentiell für den Transportvorgang des Holotransporters sind. BioMNY-Varianten, deren ATP-Hydrolyse durch Aminosäureaustausche des konservierten Lysins im Walker A-Motiv oder des unmittelbar benachbart zum Walker B-Motiv liegenden „katalytischen Carboxylats“ inaktiviert war, waren nicht mehr zum Biotinimport befähigt (Hebbeln *et al.* 2007, Neubauer *et al.* 2009, Finkenwirth *et al.* 2015).

Für die Holotransporter der Subklasse II ist bekannt, dass sich mehrere S-Einheiten für verschiedene Substrate ein ECF-Modul teilen (Rodionov *et al.* 2009, Neubauer *et al.* 2009, ter Beek *et al.* 2011). Es wurde vermutet, dass die Konformationsänderung der T-Einheit zum Aufrichten und zur gleichzeitigen Dissoziation der unbeladenen S-Einheit führt, wodurch eine neue, substratbeladene S-Einheit an den Komplex binden kann (Slotboom 2014, Karpowich *et al.* 2015). Im Falle der ECF-Transporter der Subklasse I konnten bisher keine Hinweise darauf gefunden werden, dass ein Austausch der S-Einheiten für den Transportzyklus nötig ist. Die Bindung von ATP an BioMNY und die daraus resultierende Konformationsänderung der A- und T-Einheiten führte nicht zu einer Dissoziation von BioY (Ogienko 2014). Es gibt jedoch Hinweise, dass *in vitro* ausschließlich in Abwesenheit von ATP die Zugabe von Biotin die Dissoziation von BioY aus dem Komplex bewirkt (F. Finkenwirth, persönliche Mitteilung). Weitere Analysen müssen jedoch klären, ob das Ablösen der S-Einheiten in ECF-Transportern der Subklasse I *in vivo* relevant ist.

Auch beim Substrattransport durch S-Einheiten ohne das ECF-Modul muss ein alternierender Zugang zur Substratbindestelle entweder vom Periplasma oder vom Cytoplasma aus gewährleistet sein. Ebenso wie im ECF-Holotransporter kann auch hier vermutet werden, dass das Kippen der S-Einheit für den Transportvorgang mechanistisch notwendig sein könnte. Bei dieser Variante des Transportmechanismus der ECF-Transporter könnte aufgrund des geringen Bedarfs an Vitaminen bzw. Nickel oder Kobalt in der Zelle selbst ein nur sporadischer Wechsel zwischen den verschiedenen Orientierungen der S-Einheit in der Membran für einen zum Wachstum ausreichenden Substrattransport genügen. Beim Wechsel der S-Einheit zwischen der aufrechten und der quer zur Membran orientierten Position muss die energetische Barriere der Membran überwunden werden, indem die hydrophilen Loops vor der hydrophoben Membrenumgebung geschützt werden. Diese Schutzfunktion könnte in

Abwesenheit der T-Einheit durch ein anderes Protein erfolgen (Slotboom 2014). Der die T-Einheit ersetzende Interaktionspartner könnte im Falle der BioY-Proteine ein zweites BioY im funktionellen Dimer sein. Diese Hypothese ist in Abbildung 37 C auf Seite 71 gezeigt. Im Falle der metallspezifischen S-Einheiten ist noch zu klären, ob ebenfalls eine Dimerisierung der S-Einheiten die Transportfunktion ohne ECF-Modul ermöglicht und welche Rolle die für den Transport essentielle N-Komponente spielt. In Kapitel 3.5 wird die potentielle Rolle der N-Komponente besprochen.

3.3.2 Die Oligomerisierung von BioY

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten oligomere S-Einheiten nachgewiesen werden. Hetero-FRET-Untersuchungen in lebenden Zellen belegten oligomeres BioY aus *R. capsulatus* (Finkenwirth *et al.* 2010) und *in vitro* wurde neben monomerem (D.J. Slotboom, O. Neubauer und T. Eitingen, unveröffentlichte Daten) auch dimeres BioY nachgewiesen (Fisher *et al.* 2012, Hebbeln *et al.* 2007). Ein Teil der *in vitro* vom Oligomer separierten BioY-Monomere oligomerisieren außerdem zeitabhängig nach einer einwöchigen Inkubation. Andere S-Einheiten kommen ebenfalls als Oligomere vor. Die einzeln kristallisierten S-Einheiten SaRibU und L/ThiT liegen in der asymmetrischen Einheit als Dimer und L/BioY liegt als Trimer vor (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012). Die aufgrund der *positive-inside*-Regel (Slotboom 2014) sowie aufgrund molekulardynamischer Computersimulationen (Majsnerowska *et al.* 2013) angenommene senkrechte Orientierung der S-Einheiten führte zu der Hypothese, dass die Oligomere nicht relevant und die S-Einheiten als Monomere funktionell wären (Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012). Mit Kenntnis der Struktur der ECF-Holotransporter erinnern die jeweils quer zueinander orientierten S-Einheiten innerhalb der asymmetrischen Einheiten jedoch stark an die quer zur T-Einheit orientierten S-Einheiten der kristallisierten ECF-Holotransporter und eine biologische Relevanz der Oligomere kann nicht ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch „Pull-down“-Untersuchungen gezeigt werden, dass *in vitro* mindestens 36 % der RcBioY-Proteine als Dimer vorlagen. Neben RcBioY zeigten elf weitere, untersuchte BioY-Proteine in Detergenzlösung Monomere und Oligomere, da sie bei der Untersuchung mittels Größenausschluss-Chromatografie in mindestens zwei Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten eluierten. Der jeweilige Peak mit der längsten Retentionszeit enthielt das Monomer. Der oder die schneller eluierenden Peaks enthielten Moleküle mit einem erhöhten hydrodynamischen Radius im Vergleich zu den Molekülen des Monomers. Es wurde vermutet, dass die Peaks mit kürzerer Retentionszeit die Dimere mit

einer sie umgebenden, unbekannten Anzahl von Detergenzmolekülen enthielten, da alle untersuchten BioY-Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel neben dem Monomer eine SDS-resistente, oligomere Form in Höhe des Dimers aufwiesen. Das SDS-resistente Dimer wurde beispielsweise auch für das solitäre BioY aus *Chlamydia* spp. beschrieben (Fisher *et al.* 2012). Mittels SEC-MALLS (*size-exclusion chromatography* gekoppelt mit *multi-angle laser light scattering*)-Untersuchungen könnte in einem Folge-Experiment bestätigt werden, dass die schneller eluierenden Peaks das Dimer enthalten. Dimere wurden sowohl für BioY-Proteine der Subklassen I und II als auch für solitär vorkommende BioY-Proteine beobachtet und daher könnte die Oligomerisierung eine grundlegende Eigenschaft aller BioY-Proteine darstellen.

Die Oligomerisierung erfolgt unabhängig davon, ob Substrat anwesend ist, da *RcBioY* aus in biotinfreiem Minimalmedium kultivierten Zellen bevorzugt das Dimer ausbildete, aber auch *RcBioY* aus in Vollmedium kultivierten Zellen neben dem Monomer als Dimer vorlag. Das durch Größenausschluss-Chromatografie vom Dimer separierte monomere BioY aus in Vollmedium kultivierten Zellen lag nach einwöchiger Inkubation in Pufferlösung ohne zusätzlich zugegebenes Biotin zu einem Drittel als Oligomer vor. In Gegenwart von Biotin verringert sich jedoch zumindest *in vitro* die Tendenz von BioY zur Oligomerisierung, da bei Zugabe von mindestens äquimolaren Biotinmengen zu biotinfrei isoliertem *RcBioY* die Dissoziation der BioY-Dimere zum Monomer erfolgte und sich eine Stöchiometrie von einem Molekül Biotin pro einem BioY-Protein ausbildete. Die Bindung des Substrats könnte sowohl durch oligomeres BioY erfolgen, welches anschließend zum Monomer dissoziierte, als auch durch vor der Substratbindung dissoziiertes, monomeres BioY. Ein geringer Anteil des Proteins konnte auch nach Zugabe von Biotin im Überschuss noch als biotinfreies Dimer nachgewiesen werden, stellte aber möglicherweise nicht mehr funktionsfähiges Protein dar oder könnte bei einer längeren Inkubation mit Biotin noch zum Monomer dissoziieren. Die 1:1-Stöchiometrie (Biotin pro BioY-Protein) wurde für *RcBioY* in Detergenzlösung auch mittels der Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Apoproteins bestätigt. Die Fluoreszenz veränderte sich bei Vorhandensein von äquimolaren Molekülmengen von Biotin und BioY nicht mehr, was eine abgesättigte Substratbindung bestätigte (Berntsson *et al.* 2012). Die *in vitro* beobachtete Stöchiometrie von 1:1 für Biotin und *RcBioY* korreliert mit der 1:1-Stöchiometrie anderer S-Einheiten mit ihrem Substrat in Detergenzlösung (Erkens & Slotboom 2010, Duurkens *et al.* 2007, Berntsson *et al.* 2012).

Die 1:1-Stöchiometrie konnte bei BioY nur beobachtet werden, wenn Biotin nachträglich zu Apo-BioY zugegeben wurde. Die Analyse des schon vor der Proteinisolierung an BioY gebundenen Biotins – dieser Zustand wird im Folgenden als *as isolated* bezeichnet – zeigte,

dass selbst bei Zugabe von bis zu 1 μ M Biotin zum Vollmedium nicht alle BioY-Proteine mit Biotin besetzt waren. Die exakte Biotinkonzentration in Vollmedium ist nicht bekannt, beträgt aber mindestens 20 nM Biotin, da die Zugabe dieser Biotinmenge zu Vollmedium den Beladungszustand von BioY nicht beeinflusste. Trotz der hohen Substrataffinität und der Substratverfügbarkeit im Vollmedium wurde mindestens eine 1:2-Stöchiometrie und maximal eine Stöchiometrie von 1:1,4 beobachtet. Der Grund für das Vorkommen unbeladener BioY-Proteine könnte die funktionelle Dimerisierung von BioY-Proteinen sein, wobei ein BioY-Protein im Dimer analog zur quer zur T-Einheit liegenden S-Einheit im Holotransporter (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014) positioniert und die Substratbindestelle substratfrei nahe des Cytoplasmas lokalisiert sein könnte.

Die funktionelle Dimerisierung von BioY-Proteinen bestätigte sich bei Untersuchungen künstlicher BioY-Tandem-Fusionen mit entweder wildtypischen BioY-Domänen oder mit durch Aminosäureaustausche in der Substratbindestelle inaktivierten N-terminalen oder C-terminalen Domänen (Kirsch *et al.* 2012). Bei einer autonomen Funktion der Domänen im fusionierten Dimer würde die Inaktivierung einer Domäne dazu führen, dass die Tandem-Dimer-Varianten 50 % der Biotinbeladbarkeit der wildtypischen BioY-Tandem-Fusion aufweisen würden. Es wurde jedoch weder *in vivo* noch *as isolated* eine Biotinbeladung von 50 % beobachtet. Sowohl die wildtypischen Tandem-Dimer-Varianten als auch die Tandem-Dimer-Varianten mit einer nicht mehr zur Biotinbindung befähigten Domäne wiesen eine Beladung von einem Molekül Biotin pro vier BioY-Domänen auf.

Aufgrund der beobachteten 1:4-Stöchiometrie konnte neben der funktionellen Dimerisierung zweier BioY-Domänen eines Dimers die Interaktion zweier Domänen unterschiedlicher Polypeptidketten nachgewiesen werden. Würden im Falle des Tandem-Dimers mit zwei wildtypischen Domänen ausschließlich die beiden Domänen eines Tandem-Dimers funktionell dimerisieren, wäre analog zu zwei dimerisierten, unfusionierten BioY-Proteinen eine Biotinbeladung der Domänen mit einer 1:2-Stöchiometrie zu erwarten gewesen. Die beobachtete 1:4-Stöchiometrie war nur mit der funktionellen Dimerisierung der kovalent verknüpften Tandem-Dimere erklärbar. Die für BioY-Tandem-Varianten mit einer inaktivierten N-terminalen oder C-terminalen Domäne beobachtete 1:4-Stöchiometrie – anstelle einer 1:2-Stöchiometrie – bestätigte ebenfalls die funktionelle Dimerisierung zweier Domänen von unterschiedlichen Polypeptidketten.

Die Oligomerisierung der Tandem-Dimere bestätigte sich *in vivo* aufgrund des durch die Erhöhung des Fluoreszenz-Anisotropiewertes nachgewiesenen selteneren Auftretens von Homo-FRET-Ereignissen in Zellsuspensionen, die nicht nur fluorophorgetaggte BioY-Varianten, sondern zusätzlich ungetaggte BioY-Varianten enthielten. Je mehr ungetaggte BioY-

Domänen oligomerisierten, desto seltener traten Homo-FRET-Ereignisse auf. Auch für Proteine wie die Sensor-Histidin-Kinase DcuS des Zwei-Komponentensystems DcuSR aus *E.coli* (Scheu *et al.* 2010) oder den ABC-Exporter für Polysaccharide Wzx aus *Pseudomonas aeruginosa* (Singh *et al.* 2013) bestätigten FRET-Untersuchungen *in vivo* die Oligomerisierung.

Vor der Charakterisierung der quer zur T-Einheit orientierten S-Einheiten im Holotransporter (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014) wurden die beobachteten 1:4-Stöchiometrien dahingehend interpretiert, dass zwei BioY-Domänen von unterschiedlichen Polypeptidketten die biotinbindende Einheit darstellten und gemeinsam die Freisetzung des Substrats in der Zelle ermöglichten (Kirsch *et al.* 2012). Mit Kenntnis der bisher einzigartigen Orientierung der S-Einheiten konnte nun postuliert werden, dass die Substratfreisetzung aus der Substratbindetasche einer BioY-Domäne im Dimer erfolgt, indem diese die quer zur zweiten Domäne orientierte Position einnimmt. In Abbildung 38 ist dies für die BioY-Proteine bzw. BioY-Domänen in den Tandem-Dimer-Varianten dargestellt.

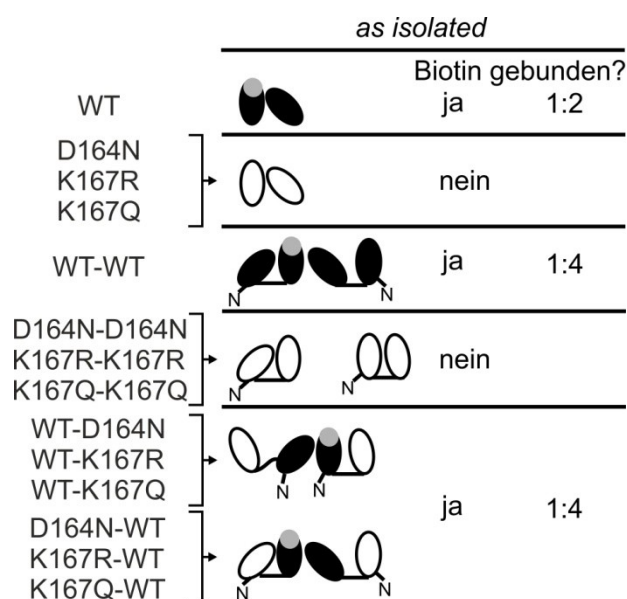


Abbildung 38: Modell für die Interpretation der Funktion von BioY als Dimer. Die wildtypischen BioY-Domänen (WT) sind als schwarze Ellipsen, die inaktivierten Domänen (D164N, K167R, K167Q) als weiße Ellipsen dargestellt. Im Falle der Dimer-Varianten sind die Ellipsen miteinander verbunden und der N-Terminus ist durch „N“ markiert. Biotinbeladene Domänen sind mit einem grauen Kreis versehen. Die experimentell bestätigte Biotinbindung an wildtypischem BioY-Protein sowie den verschiedenen Tandem-Varianten nach Reinigung der Proteine (*as isolated*) ist durch „ja“ gekennzeichnet und die entsprechende Stöchiometrie (mol Biotin pro mol BioY-Domäne) angezeigt. Biotinfreie BioY-Proteine und Tandem-Varianten sind durch „nein“ gekennzeichnet.

Die Substratbeladung setzt das Vorhandensein einer intakten Substratbindestelle voraus, weshalb inaktivierte BioY-Proteine sowie Tandem-Dimere mit zwei inaktivierten Domänen kein gebundenes Biotin aufwiesen. Die funktionelle Dimerisierung zweier substratbeladener BioY-Domänen eines Dimers führte zur Umorientierung einer der beiden Domänen des Dimers und somit zur Freisetzung des Substrats aus dessen Bindetasche. Analog erfolgte die Interaktion der unfusionierten BioY-Proteine. Im Falle des wildtypischen Tandem-Dimers könnte die N-terminale Domäne bevorzugt den quer zur anderen Domäne orientierten Zustand eingenommen haben. Grund dafür könnte die im Falle der Tandem-Dimer-Varianten mit einer inaktivierten Domäne beobachtete geringere Flexibilität der C-terminalen Domäne aufgrund des sehr kurzen, die Domänen kovalent verknüpfenden Linkers sein. Eine Alternative zur Tandem-Fusion wäre die Koproduktion der einzelnen wildtypischen bzw. inaktivierten und auf unterschiedlichen Plasmiden codierten BioY-Proteine.

Die funktionelle Dimerisierung zweier wildtypischer Domänen verschiedener Polypeptide erfolgte sowohl bei den Tandem-Dimer-Varianten mit zwei wildtypischen Domänen als auch bei den Tandem-Dimer-Varianten mit nur einer wildtypischen Domäne und erklärt die beobachteten Beladungszustände von einem Molekül Biotin pro vier BioY-Domänen. Eine der interagierenden Domänen nahm die quer zur Domäne eines zweiten Dimers orientierte Position ein und das Substrat konnte die Bindestelle verlassen. Der *as isolated*-Zustand spiegelt eine Momentaufnahme im katalytischen Zyklus des Biotintransports durch dimeres BioY wider, da im Gegensatz zur Situation in der Zelle ohne zusätzlich zugegebenes Biotin keine weitere Neubeladung der Komplexe möglich war. Bei der Isolierung der BioY-Proteine stabilisierten sich daher die BioY-Dimere bzw. die dimeren BioY-Tandem-Varianten in den beobachteten 1:2- bzw. 1:4-Stöchiometrien.

In weiteren Experimenten muss die Substratbeladung insbesondere der solitär vorkommenden BioY-Proteine verifiziert werden. Eine zu RcbioY vergleichbare Stöchiometrie von einem Molekül Biotin pro zwei solitären BioY-Proteinen wäre ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Dimerisierung während des Substrattransports.

Die Dimerisierung der verschiedenen BioY-Proteine könnte analog zur Interaktion der S-Einheit mit der T-Einheit im Holotransporter über den hydrophoben Bereich der ersten Transmembranhelix bzw. die durch die Transmembranhelices 1, 2 und 6 gebildete hydrophobe Furche (Zhang *et al.* 2014, Erkens *et al.* 2011, Kiesler 2013) erfolgen. Aussagen über die Interaktionsstellen im Dimer könnten chemische Vernetzungsexperimente mit längenspezifischen Crosslinkern liefern. Es könnten die Abstände zwischen den jeweiligen Loopregionen 1, 3 und 5 untersucht werden. Im Bereich der ersten Transmembranhelix von RcbioY stehen für Abstandsuntersuchungen die Austauschvarianten A12C, A13C, V16C und

A17C zur Verfügung (Ogienko 2014). Für die Untersuchungen könnten BioY-Proteine aus in biotinfreiem Minimalmedium angezogenen Zellen genutzt werden, da BioY unter diesen Bedingungen bevorzugt als Dimer existiert. EPR-Untersuchungen mit Spinlabels in den genannten Bereichen wären ebenfalls möglich. Um zu gewährleisten, dass mit unterschiedlichen Spinlabels markierte BioY-Proteine dimerisieren, müssten diese unterschiedlich getaggt und durch das „Pull-Down“-Verfahren mittels Affinitätschromatografie kogereinigt werden. Weitere Informationen über die Interaktion eines BioY-Dimers würde außerdem die entsprechende Kristallstruktur liefern.

Die Oligomerisierung könnte für die Transportfunktion von BioY ohne ECF-Modul entscheidend sein. Hetero-FRET-Untersuchungen deuten darauf hin, dass BioY-Oligomere *in vivo* auch im Holotransporter vorkommen (Finkenwirth *et al.* 2010). Welche Funktion die BioY-Oligomere im Holotransporter bzw. die durch „Pull-down“-Untersuchungen (Karpowich & Wang 2013) oder in SEC-MALLS-Untersuchungen detektierten (ter Beek *et al.* 2011) Dimere anderer S-Einheiten im Holotransporter erfüllen, muss durch weiterführende Untersuchungen verifiziert werden.

3.3.3 Substratfreisetzung durch BioY *in vivo* und *in vitro*

Die funktionelle Dimerisierung von RcBioY, die *in vitro* für alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten BioY-Proteine nachgewiesene Dimerisierung sowie die sehr ähnliche Topologie dieser BioY-Proteine deutet darauf hin, dass alle untersuchten BioY-Proteine den gleichen Transportmechanismus nutzen. Dass die BioY-Proteine der Subklassen I und II *in vivo* dennoch keine für das Wachstum der Zellen des biotindefizienten Indikatorstammes ausreichende Biotinmenge in die Zellen transportieren konnten, deutet darauf hin, dass die Substratfreisetzung *in vivo* möglicherweise eingeschränkt war.

In vitro ist die Substratfreisetzung aus der Substratbindestelle möglich, da aufgrund der beobachteten 1:2-Stöchiometrie 50 % der RcBioY-Proteine mit unbeladener Substratbindestelle vorliegen. Bei *in vitro*-Untersuchungen ist zu berücksichtigen, dass in Detergenzlösung zwar die Destabilisierung von Transmembranproteinen verhindert, die Lipidumgebung jedoch nur imitiert wird. In Detergenzmizellen sind im Vergleich zur natürlichen Lipidumgebung Unterschiede in der Aktivität, Stabilität oder Faltung der Membranproteine zu beobachten. EPR-Untersuchungen zeigten, dass der Aspartattransporter Glt_{ph} aus *Pyrococcus horikoshii* in Lipidumgebung andere Konformationen ausbildete als in Detergenzumgebung (Hänelt *et al.* 2013, Georgieva *et al.* 2013). Auch der Molybdattransporter MolBC-A aus *Haemophilus influenza* zeigte in Detergenzlösung größere

Konformationsänderungen als in Lipidumgebung und die in Detergenz beobachtete ATPase-Aktivität reduzierte sich nach Rekonstitution in Liposomen um bis zu 90 % (Rice *et al.* 2014b). Der laterale Druck der Lipiddoppelschicht könnte durch eine Kompression der Transmembranhelices die Flexibilität der Proteine stärker beeinflussen als dies in Detergenzlösung der Fall ist (Marsh 2007). Es ist möglich, dass eine flexiblere Konformation der Transmembranhelices von BioY die Bewegungen des Loop 1 und somit die Zugänglichkeit der Substratbindestelle *in vitro* beeinflusst.

Die Konformation des Loop 1 wechselt von der die Substratbindestelle deckelartig verschließenden Struktur in den substratbeladenen S-Einheiten zu der in den S-Einheiten der Holotransporter beobachteten Struktur, welche die freie Zugänglichkeit der Substratbindestelle gewährleistet (Zhang 2013, Zhang *et al.* 2010, Erkens *et al.* 2011, Berntsson *et al.* 2012, Xu *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Wie die Öffnung des Loop 1 erfolgt, ist noch unklar, da im Holotransporter scheinbar keine Interaktion zwischen dem Loop 1 der substratfreien S-Einheit und der T-Einheit erfolgt (Xu *et al.* 2013). Konformationsänderungen der Transmembransegmente der S-Einheiten, durch die zum einen die Konformation des Loop 1 verändert und zum anderen die Affinität der Substratbindestelle herabgesetzt werden könnte, wurden zwar in Computersimulationen am Beispiel von RibU postuliert (Song *et al.* 2013), konnten aber in EPR-Untersuchungen bei Bindung des Substrats an Apo-ThiT nicht beobachtet werden (Majsnerowska *et al.* 2013). Um jedoch Aussagen zur Konformationsänderung des Loop 1 während des Substrattransports treffen zu können, sind vergleichende EPR-Untersuchungen zur Abstandsänderung im Holotransporter bei An- und Abwesenheit von Substrat und Nukleotid nötig. Möglicherweise erfolgt im substratbeladenen Zustand der S-Einheit aufgrund der hypothetischen, etwas weiter aufgerichteten Position eine Interaktion zwischen Loop 1 und T-Einheit.

Ein Vergleich der Topologiemodelle aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten BioY-Proteine zeigte, dass nur die Loopregionen und insbesondere der Loop 1 der verschiedenen BioY-Proteine voneinander abweichen, wie in Abbildung 39 dargestellt. Es sind Unterschiede in der Looplänge sowie in den im Loop 1 enthaltenen Aminosäureresten zu beobachten. Es ist vorstellbar, dass bei *RcBioY* und *L/BioY1* das an der Spitze des Loop 1 lokalisierte Phenylalanin bei einer Bewegung des Loop während des Transportvorgangs *in vivo* die Öffnung zur Substratbindestelle einengen und das Verlassen des Substrats erschweren oder unmöglich machen könnte. Verglichen mit den Loops von *RcBioY* und *L/BioY1* sind die Loopregionen der solitären BioY-Proteine kürzer und enthalten nur zum Teil große Aminosäurereste wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan. Wenn sie dennoch vorkommen, sind sie eher in Richtung der Membran als an der Spitze des Loop lokalisiert. Die Öffnung zur

Substratbindestelle könnte daher im Falle der solitären S-Einheiten *in vivo* größer sein und das Verlassen des Substrats aus der Bindestelle gestatten.

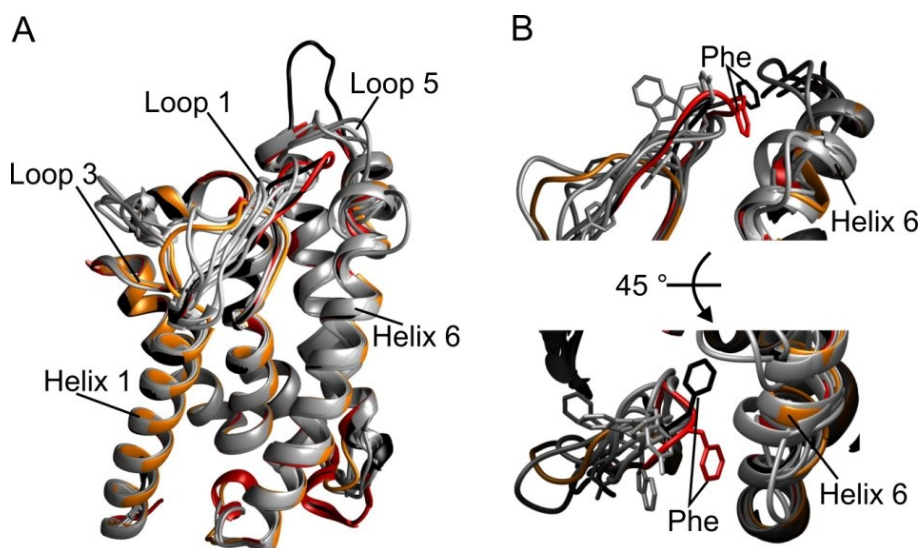


Abbildung 39: Vergleich der 3D-Strukturen verschiedener BioY-Proteine. Die Topologiemodelle von *RcBioY* (schwarz), *L/BioY2* (orange) sowie der acht solitären BioY-Proteine (*BjBioY*, *ObBioY1*, *ObBioY2*, *RdBioY*, *RnBioY*, *RpBioY*, *SpBioY1* und *SpBioY2*, alle grau) wurden nach *L/BioY1* (rot, PDB:4dve) mit SWISS-MODELL erstellt und mit Chimera 1.7 bearbeitet. In (A) sind die kompletten 3D-Modelle und in (B) nur die Loop 1-Regionen mit relevanten Aminosäuren im Bändermodell und der N-terminale Teil von Helix 6 zu sehen.

In Detergenzlösung könnte eine flexiblere Konformation der Transmembranhelices von *RcBioY* dafür verantwortlich sein, dass der Loop 1 weit genug aufklappt, um die Substratfreisetzung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu könnte *in vivo* für das korrekte Aufklappen des Loop 1 die natürlicherweise mit *RcBioY* interagierende T-Einheit *RcBioN* essentiell sein. Um die Rolle der großen Aminosäurereste im Loop aufzuklären, sollte eine *RcBioY*-Variante mit einem Aminosäureaustausch des Phenylalanins gegen kleine, hydrophobe Aminosäuren wie Valin oder Alanin auf ihre Transportkapazität in lebenden Zellen untersucht werden.

3.4 Die Struktur der metallspezifischen S-Einheiten

Der Import von Kobalt und Nickel ist aufgrund ihrer Schlüsselrolle als Kofaktoren in verschiedenen Enzymen, die in ganz unterschiedlichen metabolischen Prozessen eine Rolle spielen, essentiell für Prokaryoten. Kobalt ist das Zentralatom des Corrinrings in Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzymen wie der Methionin-Synthase (Koutmos *et al.* 2009) und kommt außerdem in Enzymen ohne Corrinring wie der Nitril-Hydratase (Pei *et al.* 2013, Kobayashi & Shimizu 1999) vor. Unter den aktuell neun sehr gut charakterisierten nickelabhängigen Enzymen (Boer *et al.* 2014) befinden sich mit der Urease und der Nickel-Eisen-Hydrogenase zwei Enzyme, die essentiell für das Wachstum von menschlichen Krankheitserregern wie *Helicobacter pylori* im Wirt sind (Lebrette *et al.* 2014). Insbesondere die Urease, welche in der vorliegenden Arbeit als Indikator für die zelluläre Nickelkonzentration genutzt wurde, ermöglicht die Metabolisierung von Harnstoff als Stickstoffquelle (Chivers 2015, Polacco *et al.* 2013). Die durch Harnstoff-Hydrolyse verursachte Alkalisierung ermöglicht pathogenen Bakterien wie *H. pylori* das Überleben im sauren Milieu des Magens des Wirtsorganismus (Lebrette *et al.* 2015, Boer *et al.* 2014, Kusters *et al.* 2006).

Nickel und Kobalt kommen im Vergleich zu anderen Metallen wie Magnesium oder Eisen nur in Spuren in der Natur vor (Eitinger & Mandrand-Berthelot 2000, Kobayashi & Shimizu 1999) und pathogene Bakterien sind mit nanomolaren Nickelkonzentrationen im menschlichen Wirtskörper konfrontiert (Christensen *et al.* 1999). Daher muss der Import hocheffizient erfolgen. Nickel und Kobalt gelangen mit Hilfe sekundärer oder primärer Transporter in die Zelle. Sekundäre Transporter sind beispielsweise die Nickel/Kobalt-Permeasen, die als NiCoT-Familie in der TCDB als TC 2.A.52 eingeordnet sind und deren Vertreter unterschiedliche Präferenzen für Nickel oder Kobalt aufweisen (Eitinger *et al.* 2005, Eitinger 2013b, Eitinger 2013c). Die ebenfalls zu den sekundären Transportern gehörende Familie der Magnesiumtransporter CorA importieren Nickel und Kobalt nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen (Eitinger & Mandrand-Berthelot 2000, Xia *et al.* 2011). Eine Ausnahme stellt CorA aus *Thermotoga maritima* dar, bei welchem die Affinität für Kobalt 100-fach höher als für Magnesium ist (Xia *et al.* 2011, Nordin *et al.* 2013). Primärer Transport erfolgt durch kanonische ABC-Importer wie den erst kürzlich entdeckten Kobalttransporter CbtJKL aus *S. meliloti* (Cheng *et al.* 2011), die sehr gut charakterisierten Nickeltransporter NikABCDE aus *E. coli* (Dosanjh & Michel 2006) und NikZYXWV aus *Campylobacter jejuni* (Howlett *et al.* 2012) oder den bis auf das SBP CeuE noch uncharakterisierten Nickeltransporter aus *H. pylori* (Shaik *et al.* 2014). Die am weitesten verbreiteten primären Transportsysteme zur Aufnahme von Nickel und Kobalt in Bakterien sind jedoch die ECF-Transporter

Cbi/NikMNQO bzw. NikMKLQO (Eitinger 2013a, 2013b, 2013c, Zhang *et al.* 2009, Rodionov *et al.* 2006).

Im Falle der Cbi/NikMNQO-Transportsysteme ist die N-Komponente, obwohl kein fester Bestandteil des Komplexes, essentiell für den Metalltransport, während für die NikN ersetzenden Komponenten NikL und NikK Untersuchungen zur Funktion bei Komplexbildung und Metalltransport noch ausstehen. Die Koordinierung der Metallionen erfolgt ausschließlich über die S-Einheit der metallspezifischen ECF-Transporter – die M-Komponente. *TtNikM2* bindet Nickel über vier Stickstoffliganden, die von der N-terminalen Aminogruppe und zwei hochkonservierten Histidinen an Position 2 und 67 bereitgestellt werden (Yu *et al.* 2014). Die Stickstoffatome in *TtNikM2* bilden eine quadratisch-planare Substratbindestelle aus, wie sie auch in der hochaffinen Nickelbindestellen im Zentrum des NikR-Tetramers in *E. coli* (Phillips *et al.* 2010) oder in der Nickelbindestelle der GTPase HypB aus *H. pylori* (Sydor *et al.* 2014) zu finden ist.

Die quadratisch-planare Geometrie des N-terminalen Nickelbindemotivs in *TtNikM2* erinnert an das aminoterminal-Kupfer-und-Nickel (ATCUN)-Motiv. In dem in verschiedenen Albuminen wie beispielsweise dem humanen Serum Albumin HSA (Laussac & Sarkar 1984) vorkommenden Motiv werden die Metalle hochaffin durch die N-terminale Aminogruppe, zwei Stickstoffatome des Peptidrückgrats und ein Stickstoffatom des Imidazols eines Histidins an Position 3 quadratisch-planar ligandiert (Neupane *et al.* 2014). Für die S-Einheiten NikM und CbiM aus *R. capsulatus* wurde die essentielle Rolle der N-terminalen Aminogruppe, des Histidins an Position 2 und des Abstands zwischen diesen beiden Liganden für die Metallbindung nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte durch Aminosäureaustausche bzw. Insertionen innerhalb des konservierten N-Terminus (Rodionov *et al.* 2006, Siche *et al.* 2010). In ATCUN-ähnlichen Motiven ist der Austausch des His3 gegen Cystein oder Aspartat zwar möglich, aber die Entfernung zum aminoterminalen Ende ist ebenfalls essentiell für die Stabilität der Substratbindestelle (Neupane *et al.* 2014, Harford & Sarkar 1995). Bei anderen Proteinen mit N-terminaler Metallbindestelle wie dem Nickel und Kobalt bindenden DNA-Bindeprotein RcnR aus *E. coli* und NmtR aus *Mycobacterium tuberculosis* oder dem Metallchaperon HypA aus *H. pylori* wird der für die Ausbildung der Substratbindestelle benötigte Abstand zwischen His2 und N-terminaler Aminogruppe durch N-terminale Prozessierung der ersten Aminosäure erhalten (Iwig *et al.* 2008, Reyes-Caballero *et al.* 2011, Johnson *et al.* 2015, Herbst *et al.* 2010). Gegenwärtig ist *TtNikM2* das einzige charakterisierte Protein mit N-terminaler Nickelbindestelle, bei welchem ohne N-terminale Prozessierung Histidin an Position 2 vorkommt (Chivers 2015). Es kann jedoch aufgrund eines Vergleiches der 102 in der SEED-Datenbank hinterlegten NikM-Proteine vermutet werden, dass bei einem

großen Teil der noch nicht charakterisierten NikM-Proteine ebenfalls die Nickelbindestelle ohne N-terminale Prozessierung ausgebildet werden kann. 71 % der NikM-Proteine weisen Met1 und His2 auf. Weitere 11 % weisen möglicherweise resultierend aus einem fehlerhaft annotierten Start-Codon zusätzlich minimal 5 und maximal 67 Aminosäuren vor den beiden für die Metallligandierung verantwortlichen Resten Met und His im konservierten MHIPDGFLS-Motiv auf. Bei den restlichen 18 % könnte eine N-terminale Prozessierung nötig sein, da hier entweder Alanin oder bis zu 28 zusätzliche Aminosäuren das Histidin vom Met1 trennen. Im Falle von CbiM erfolgt bei 66 % der Proteine aufgrund der N-terminalen Signalsequenz eine N-terminale Prozessierung während des Proteineinbaus in die Membran (Rodionov *et al.* 2006).

Trotz der ähnlichen N-terminalen Bindestelle von *Tt*NikM2 und den Nickel und Kobalt bindenden DNA-Bindeproteinen erfolgt bei letzteren die Koordinierung der Metallionen oktaedrisch durch zusätzliche Histidin- oder Cysteinreste (Iwig *et al.* 2008, Reyes-Caballero *et al.* 2011, Higgins *et al.* 2013). Die Nickelbindung in NikA aus *E. coli*, *S. aureus* oder *Brucella suis* bzw. in verschiedenen NikA-Homologen wie NikZ aus *C. jejuni* oder YntA aus *Yersinia pestis* wird ebenfalls als vermutlich oktaedrisch diskutiert (Lebrette *et al.* 2015, Lebrette *et al.* 2014, Chivers *et al.* 2012). Auch andere nickelabhängige Proteine wie die Glyoxalase GlxI aus *E. coli* (Boer *et al.* 2014) oder das Metallchaperon SlyD aus *E. coli* (Kaluarachchi *et al.* 2012) koordinieren Nickel oktaedrisch.

*Tt*NikM2 interagiert direkt ohne die Hilfe von Chelatorkomplexen mit dem Metallion. Für SBP wie *Sm*CbtJ oder *Cj*NikZ wurde ebenfalls die Metallbindung ohne Chelatoren vermutet (Cheng *et al.* 2011) bzw. bestätigt (Lebrette *et al.* 2014). Hingegen koordinieren NikA und NikA-Homologe wie *Yp*YntA das Nickelion mit Hilfe von Chelatorkomplexen wie Thiazolidin-ähnlichen Chelatoren, Fe(III)EDTA oder noch unbekannten organischen Chelatoren oder nutzen carboxylierte Moleküle wie L-Histidin als sogenannte Nickelophore (Chivers 2015, Shaik *et al.* 2014, Lebrette *et al.* 2014, Lebrette *et al.* 2013). Für *Sa*NikA und *Ec*NikA konnte der natürlich vorkommende Ni(L-His)₂-Komplex als physiologisches Substrat nachgewiesen werden (Lebrette *et al.* 2015, Chivers *et al.* 2012). Die Chelatorkomplexe werden in den Bindestellen der SBP durch moderat konservierte Arginin- oder Tryptophanreste stabilisiert und die oktaedrische Koordinierung wird meist durch ein bis drei einzelne, konservierte Histidine vervollständigt (Lebrette *et al.* 2014, Cavazza *et al.* 2011). Das in *Tt*NikM2 an der Ausbildung der quadratisch-planaren Bindestelle beteiligte His67 ist im ersten extracytoplasmatischen Loop lokalisiert. Es ist essentiell für die Nickelbindung, da eine Veränderung – wie in *Rc*Nik(M_[H67A]N)QO – die Substratbindestelle durch das Fehlen eines der vier Liganden destabilisiert, wie in Abbildung 40 C dargestellt ist. Durch

Aminosäureveränderungen wurde auch in HypB oder RcnR die Beteiligung spezifischer Histidinreste als Liganden von Nickel oder Kobalt bestätigt (Sydor *et al.* 2014, Higgins *et al.* 2013).

Die Position des Nickelliganden His67 wird durch ein Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Veränderungen der beteiligten Aminosäuren verhindern im Falle von *RcNik(MN)QO* zum Teil die Funktion der S-Einheit durch die Fixierung der planaren Geometrie (Yu *et al.* 2014, Chivers 2015). Das anhand der Strukturdaten errechnete Wasserstoffbrückennetz von *TtNikM2* (Yu *et al.* 2014) ist in Abbildung 40 A dargestellt.

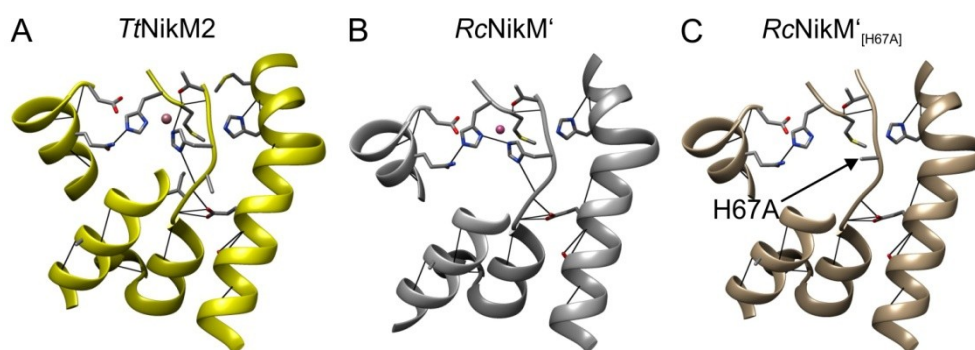


Abbildung 40: Das Wasserstoffbrückennetz von *TtNikM2* (A), *RcNikM'* (B) und *RcNikM'*_[H67A] (C). Die Substratbindestelle sowie das Wasserstoffbrückennetz wurden mit Chimera 1.7 erstellt. Die NikM-Varianten *RcNikM'* (silber) und *RcNikM'*_[H67A] (bronze) wurden nach *TtNikM2* (PDB: 4m58, gold) mit SWISS-MODEL modelliert.

Die N-terminale freie Aminogruppe interagiert mit Thr65 und darüber hinaus mit einem Wassermolekül (Yu *et al.* 2014), welches in dem mit Chimera erstellten Modell nicht berücksichtigt werden konnte. Dieses Wassermolekül interagiert weiterhin mit der Carbonylgruppe von His67 und dem Imidazolring von His190. His190 interagiert mittels des Imidazolrings außerdem mit der Carbonylgruppe des Met186. Wasserstoffbrücken zwischen dem Imidazolring des His67 und der Carbonylgruppe von Ala68, zwischen der Seitenkette des Glu198 und der Aminogruppe des Ile69 sowie zwischen dem Imidazolring von His2 und der Seitenkette von Gln94 bilden eine zusätzliche Stabilisierung der Substratbindestelle. Im nach *TtNikM2* modellierten *RcNikM'* (ohne NikN) zeigt sich ein identisches Wasserstoffbrückennetz, wie in Abbildung 40 B zu sehen ist.

Die Auswirkungen der in *RcNik(MN)QO* durchgeführten Veränderungen der einzelnen Aminosäurereste sind in den Abbildung 41 A-C modelliert und nach den Veränderungen sortiert, welche den Transporter vollständig (A), teilweise (B) oder gar nicht (C) inaktivierten. Nicht tolerierte Veränderungen stabilisierten die planare Geometrie so stark, dass keine Bewegungen innerhalb des Ligandenfeldes der Substratbindestelle mehr möglich waren und

Nickel nicht gebunden werden konnte (E202N/Q/A, H194A/E). Die Hydroxygruppe des Asp100 scheint essentiell für die Funktion von NikM zu sein, da ein Austausch nach Asparagin die Funktion von *RcNik*(M_[D100N]N)QO vollständig verhinderte. Möglicherweise ist auch Aspartat an der Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzes beteiligt, obwohl die *TtNikM2*-Struktur keinen deutlichen Hinweis in dieser Richtung gab (Yu *et al.* 2014).

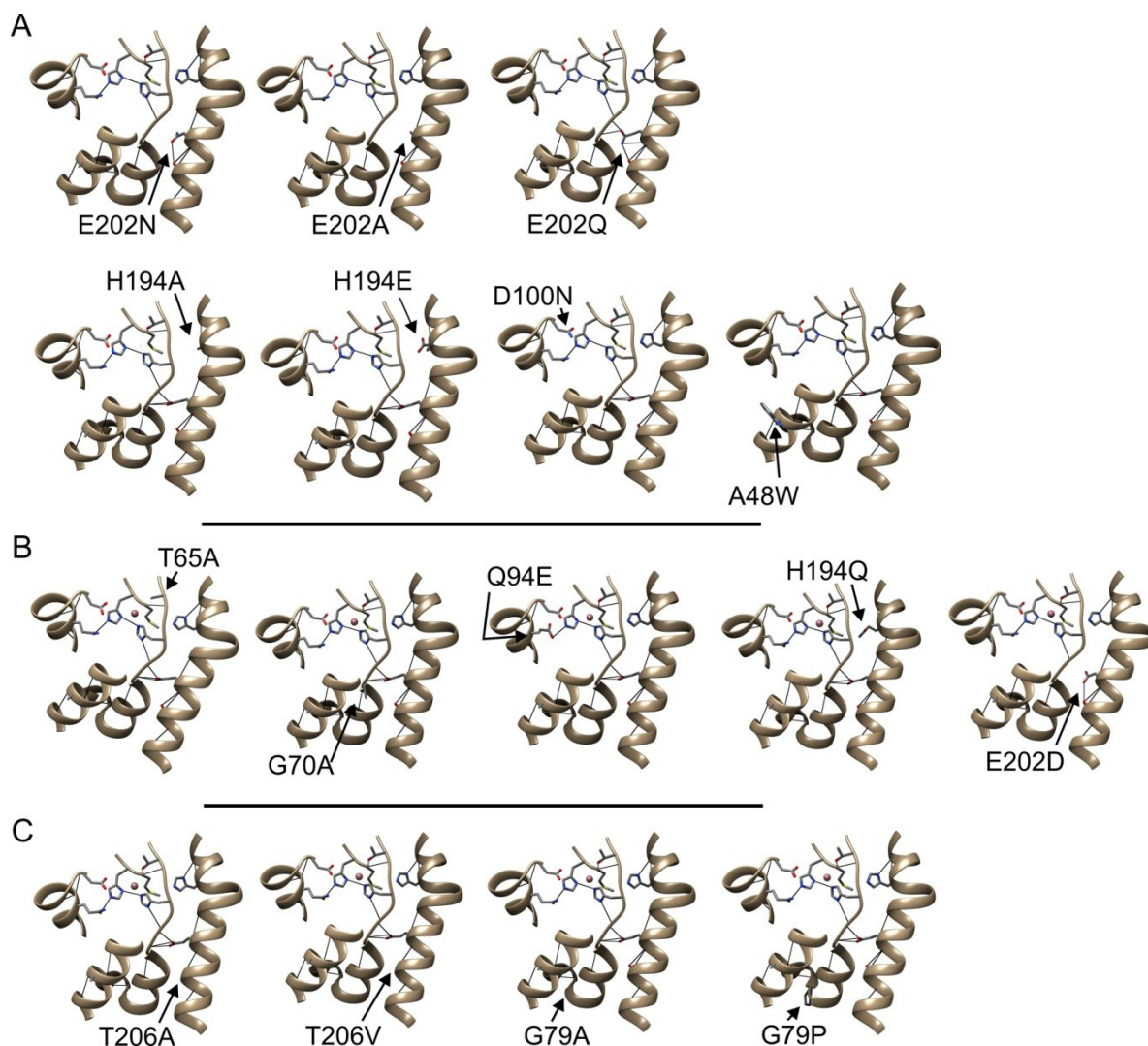


Abbildung 41: Auswirkungen der Aminosäureaustausche in *RcNik*(MN)QO auf das Wasserstoffbrückennetz. Der NikM-Teil der anhand von *TtNikM2* (PDB: 4m58) modellierten *RcNik*(MN)QO-Varianten wurde mit Chimera 1.7 bearbeitet und das Wasserstoffbrückennetz wurde jeweils eingezeichnet. **(A)** inaktive Varianten, **(B)** Varianten mit reduzierter Nickelakkumulation auf 30-60 % des Wildtyps und **(C)** Varianten mit ungefährender Wildtypaktivität. Pfeile markieren die veränderten Reste. Nickel ist als rosa Ball dargestellt.

Der Aminosäureaustausch A48W könnte zu sterischen Auswirkungen auf die Position von Helix 2 haben. Zum anderen könnte dieses Alanin an der Interaktion von *RcNik*(MN) mit der T-Einheit NikQ beteiligt sein. Die Position von Ala48 in der zweiten Transmembranhelix von NikM entspricht der Position der für die Interaktion mit der T-Einheit essentiellen

hydrophoben Aminosäuren Alanin oder Valin in der ersten Transmembranhelix der vitaminspezifischen S-Einheiten (Kiesler 2013, Erkens *et al.* 2011). Analog zum Biotintransporter sollte für *RcNik(MN)QO* mittels der Untersuchung der Nickelakkumulation in Zellen analysiert werden, ob im Gegensatz zum A48W-Austausch ein Austausch von Alanin mit der kleinen, hydrophobe Aminosäure Valin ebenso wie in *BioMNY* (Kiesler 2013) toleriert wird.

Bei anderen untersuchten *RcNik(MN)QO*-Varianten blieben die für die Interaktion über Wasserstoffbrücken nötigen funktionellen Gruppen erhalten (E202D, Q94E, T65A) oder wurden durch ein Äquivalent (H194Q) ersetzt, sodass das Wasserstoffbrückennetz weiterhin ausgebildet werden konnte. Der Austausch von G70A hat vermutlich nur geringe sterische Auswirkungen auf die Position von Helix 3 und His67. Gly79 und Thr206 haben hingegen keinen Einfluss auf die Funktion von *NikM*, da Austausche toleriert wurden.

Die Aktivität der Varianten T65A, G70A, Q94E, H194Q und E202D bewegte sich mit etwa 30-60 % der Aktivität des Holotransporters *RcNik(MN)QO* auf dem Niveau der minimalen Transporteinheit *Nik(MN)*. In weiterführenden Experimenten wäre daher durch Analyse der Ureaseaktivität und der Metallakkumulation in Zellen zu untersuchen, ob die genannten Veränderungen die Transportaktivität von *Nik(MN)* unbeeinflusst lassen. Sollten die Experimente dies bestätigen, könnte dies darauf hindeuten, dass die reduzierten Aktivitäten der entsprechenden *RcNik(MN)QO*-Varianten weniger durch die Destabilisierung der Substratbindestelle bedingt waren. Vielmehr könnte in diesen Varianten die Interaktion der veränderten S-Einheiten mit dem Energetisierungsmodul gestört gewesen sein, was dem Zustand der einzeln in Zellen vorliegenden minimalen Transporteinheit *Nik(MN)* entsprechen würde. Aus diesen Untersuchungen könnten Erkenntnisse über Interaktionsstellen zwischen *NikM* und der T-Einheit *NikQ* gewonnen werden.

Die Position der für die Metallbindung und die Stabilisierung der Substratbindestelle essentiellen Reste in *TtNikM2* ist vergleichbar mit der Position der Reste, welche in den vitaminspezifischen S-Einheiten mit den Substraten interagieren. Abgesehen von der zusätzlichen N-terminalen Helix mit dem für die Substratbindung essentiellen N-terminalen Bereich ähneln sich die 3D-Strukturen der sechs bisher kristallisierten vitaminspezifischen S-Einheiten und jene von *TtNikM2*. Bei mindestens 148 verglichenen C α -Atomen wurden mittels einer Analyse mit DALI Übereinstimmungen mit r.m.s.d-Werten von 2,9-3,3 Å berechnet. Die N-terminalen Bereiche der vitaminspezifischen S-Einheiten (Helix V1-V3, V für vitaminspezifisch) und *TtNikM2* (Helix M2-M4, M für metallspezifisch bzw. *NikM*) weisen eine wesentlich niedrigere, strukturelle Variabilität auf als die C-terminalen Bereiche (Helix V4-V6 der vitaminspezifischen S-Einheiten und Helix M5-M7 von *NikM*). Die Abweichungen der

C-terminalen Helices liegen darin begründet, dass chemisch und strukturell sehr verschiedene Substrate in den Bindetaschen gebunden werden (Berntsson *et al.* 2012, Zhang 2013, Zhang *et al.* 2014). Die Abweichungen sind in der Überlagerung von *TtNikM2* mit *L/BioY* in Abbildung 42 A sowie in der Überlagerung aller sechs bisher kristallisierten vitaminspezifischen S-Einheiten in Abbildung 42 B zu erkennen.

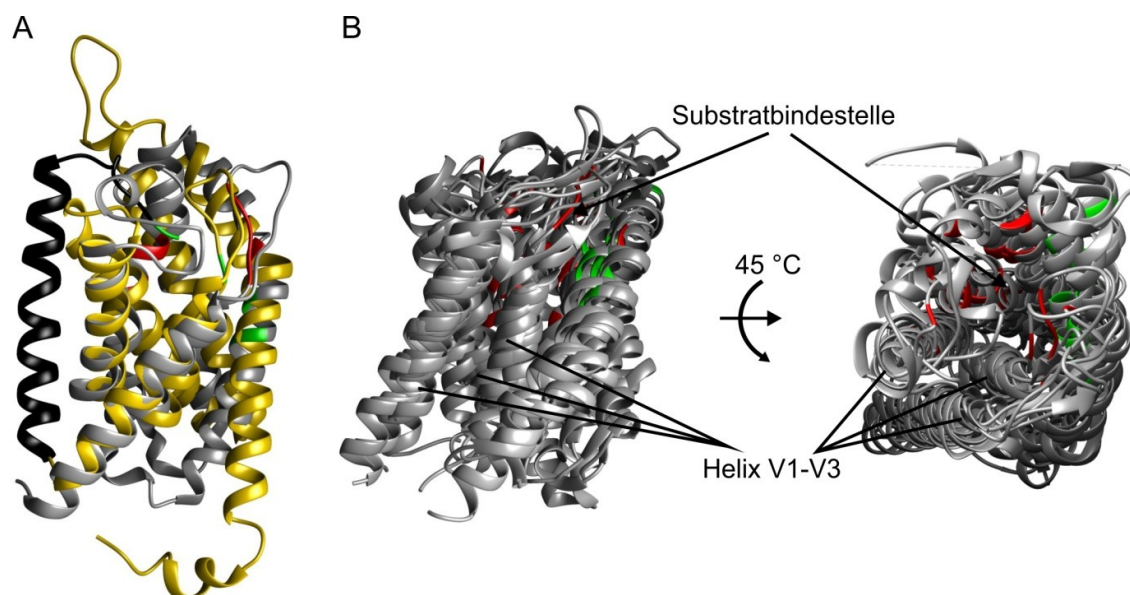


Abbildung 42: Topologievergleich von sechs vitaminspezifischen S-Einheiten und *TtNikM2*. Die 3D-Modelle von (A) *TtNikM* (Helix M1 schwarz, Helix M2-7 gold, PDB: 4m58) und *L/BioY* (grau, PDB: 4dve) bzw. von (B) *SaRibU* (PDB: 3p5n), *L/ThiT* (PDB: 3rlb), *L/BioY*, *LbFolT* (S-Einheit aus PDB: 4huq), *LbPdxU* (S-Einheit aus PDB: 4hzu) und *LbPanT* (S-Einheit aus PDB: 4rfs) wurden übereinander gelegt und identisch ausgerichtet. Die an der Substratbindung beteiligten Aminosäurereste sind rot bzw. grün markiert. Grün markierte Reste wurden experimentell bestätigt und/oder sind in Helix V6 lokalisiert; rot markierte Reste befinden sich im Bereich zwischen Loop V2 und Helix V5. Die Strukturen wurden mit Chimera 1.7 erstellt.

Die Position von His67 im ersten extracytoplasmatischen Loop von NikM entspricht den im Loop V1 der vitaminspezifischen S-Einheiten lokalisierten, direkt mit den Vitaminen interagierenden Aminosäureresten. *SaRibU* bindet den Ribitol-Teil des Riboflavins mit Tyr41 und Leu42 (Zhang *et al.* 2010), *L/ThiT* interagiert mit dem Thiazolring des Thiamins über Trp34 (Erkens *et al.* 2011) und die Interaktion mit dem Imidazolring des Biotins erfolgt in *L/BioY* durch Pro37 und Ile39 (Berntsson *et al.* 2012). Die Bindung der Vitamine erfolgt weiterhin durch Aminosäuren in Helix V6. Asp164 und Lys167 interagieren in *SaRibU* mit dem Isoalloxazin-Ring des Riboflavins (Zhang *et al.* 2010), Tyr146 und Asp151 binden in *L/ThiT* den Pyrimidinring des Thiamins (Erkens *et al.* 2011) und Asp163 und Lys166 in *L/BioY* bzw. Asp164 und Lys167 in *RcBioY* interagieren mit dem Ureidoring des Biotins (Berntsson *et al.* 2012, Kirsch *et al.* 2012). Für FolT, PdxU und PanT aus *L. brevis* wurde die

Substratbindestelle trotz substratfrei kristallisiertem Zustand ebenfalls im Bereich der Helices V4-V6 postuliert (Zhang *et al.* 2014, Xu *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013).

Die konservierten Reste in Helix V6 sind an einer ähnlichen Stelle positioniert wie die für die Stabilisierung der Substratbindestelle mitverantwortlichen konservierten Reste His190 sowie Glu198 in Helix M7 in *TtNikM2*. Die exakte Koloalisation der konservierten Reste im jeweils ersten extracytoplasmatischen Loop sowie in der jeweils letzten Transmembranhelix lässt Spekulationen über die Entwicklung der jeweiligen Substratbindestellen zu. Die quadratisch-planare Nickelbindestelle inklusive des an der Substratbindung beteiligten His67 könnte aus der für die vitaminspezifischen S-Einheiten üblichen durch Loop V1 und Transmembranhelix V6 gebildeten Substratbindestelle hervorgegangen sein. Alternativ könnte die Substratbindestelle ursprünglich N-terminal lokalisiert gewesen sein und der Verlust der für CbiM und NikM spezifischen Helix M1 führte zur Ausbildung der vitaminspezifischen Substratbindestelle unter Beteiligung der Liganden im Loop V1 und der letzten Transmembranhelix.

CbiM und NikM sind phylogenetisch auf Basis der Aminosäuresequenzen in klar voneinander abgrenzbare Cluster zu trennen. NikM bildet darüber hinaus zwei voneinander getrennte, phylogenetisch heterogene Untergruppen, die durch die Interaktion mit entweder NikN oder NikL und NikK charakterisiert sind (Rodionov *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2009). Innerhalb der CbiM-Familie weisen die Vertreter Sequenzähnlichkeiten von 56 % auf. Innerhalb der NikM-Familie besitzen die Vertreter aufgrund der phylogenetisch trennbaren Untergruppen noch geringere Sequenzähnlichkeiten von nur 27 %. Ein Auszug des Alignments von 102 NikM- und 80 CbiM-Proteinsequenzen, die aus der SEED-Datenbank entnommen wurden, ist im Anhang in Abbildung 50 und Abbildung 51 zu finden. Bei einer Sequenzähnlichkeit von 28 % ist die Topologie von *RcCbiM* und *TtNikM2* mit einem r.m.s.d-Wert von 1,0 Å bei 212 verglichenen α -Atomen sehr ähnlich. Die vier Stickstoffliganden der quadratisch-planaren Substratbindestelle von *RcCbiM* werden von der N-terminalen Aminogruppe, His2 und His69 bereitgestellt. Ebenso wie bei *TtNikM2* (Yu *et al.* 2014) ragt der N-Terminus von *RcCbiM* weit in das Protein hinein.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Substratbindestelle von *RcCbiM* im beladenen Zustand selbst unter denaturierenden Bedingungen stabil bleibt. *In vitro* wurden für transportaktive Varianten des künstlich fusionierten Cbi(MN) mit Aminosäureaustauschen im N-Terminus ebenso wie für den Cbi(MN)-Wildtyp zwei elektrophoretisch unterschiedlich laufende Proteinformen beobachtet, während 11 transportinaktive Varianten jeweils nur die langsamer laufende Proteinform aufwiesen. Die schneller laufende Proteinform könnte die metallgebundene Form darstellen. Eine Komplexierung der in Cbi(MN) gebundenen

Metallionen durch den Chelator 4-(2-Pyridylazo)-Resorcinol (PAR) (McCall & Fierke 2000) war vermutlich aufgrund der bei allen bisher untersuchten S-Einheiten beobachteten, hochaffinen Substratbindung (Berntsson *et al.* 2012, Duurkens *et al.* 2007, Eudes *et al.* 2008, Erkens & Slotboom 2010) nicht möglich. Es konnte keine abweichende Absorption des Chelators PAR im Vergleich von Cbi(MN) mit der metallfrei vorliegenden Cbi(M_[H₂D]N)-Variante beobachtet werden (Siche 2010). Der Nachweis eines eventuell in die nicht denaturierte und somit mobilere Form eingebauten Metallions könnte durch Massenspektrometrie oder optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma erfolgen (ICP-MS oder ICP-OES). Alternativ könnte die Autoradiografie genutzt werden, um die Metallbindung radioaktiv markierter Metallionen an die schneller laufende Proteinform nachzuweisen.

Die Metallbindung stabilisiert vermutlich die Struktur des Holoproteins CbiM bzw. Cbi(MN). Metalloproteine weisen eine abweichende Topologie zwischen Apoprotein und Holoprotein auf. Der im Apoprotein flexible N-terminale Bereiche des Repressors NmtR aus *M. tuberculosis* wird beispielsweise durch die Bindung von Nickel an der N-terminalen Nickelbindestelle stabilisiert (Lee *et al.* 2012) und beim Metallchaperon HypA aus *H. pylori* ändert sich die Struktur der Zinkbindestelle in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Nickel in der Nickelbindestelle (Herbst *et al.* 2010, Johnson *et al.* 2015).

Im Unterschied zu *RcCbi*(MN) wiesen *RcNik*(MN) und *RcNik*(M_[H₂Y]N) bei elektrophoretischer Auftrennung jeweils das gleiche Laufverhalten mit nur einer Proteinform auf. *RcNik*M koordiniert ebenso wie *TiNik*M2 oder *RcCbi*M die Metallionen über den weit in das Protein hineinragenden N-Terminus. Das Auftreten von nur einer Mobilitätsform von *RcNik*(MN) im Unterschied zu zwei verschiedenen Mobilitätsformen bei *RcCbi*(MN) könnte möglicherweise weniger in der Metallbindung als vielmehr in der natürlicherweise vorkommenden Fusion von *Nik*(MN) begründet liegen. Eine Klärung der Frage, ob die Fusion von M und N die elektrophoretische Mobilität beeinflusst, könnte durch die Analyse der elektrophoretischen Laufformen von künstlich fusionierten *Nik*(MN)-Varianten erbracht werden, die entsprechend *RcCbi*MN im natürlichen Zustand ebenfalls unfusioniert als *Nik*MN vorliegen.

3.5 Die potentielle Funktion der N-Komponente

Die zusätzliche N-Komponente ist kein fester Bestandteil des metallspezifischen ECF-Transporterkomplexes MQO (Siche *et al.* 2010), obwohl die funktionelle Interaktion der N-Komponente mit der S-Einheit beziehungsweise mit dem MQO-Transporterkomplex

essentiell für die jeweilige Transportfunktion ist (Kirsch & Eitinger 2014, Rodionov *et al.* 2006, Siche *et al.* 2010). Bei natürlich oder künstlich fusioniert vorliegenden M- und N-Komponenten erfolgt ebenfalls eine funktionelle Interaktion mit dem ECF-Modul. Diese Interaktion äußert sich in einer drei- bis vierfach erhöhten Transportaktivität von *RcCbi/Nik(MN)QO* verglichen mit *RcCbi(MN)* bzw. *RcNik(MN)* (Siche *et al.* 2010, Kirsch & Eitinger 2014). Sowohl mit künstlich fusioniertem *RcCbi(MN)* (Siche 2010) als auch mit natürlicherweise fusioniertem *RcNik(MN)* im Holotransporter verringert sich jedoch die Stabilität der Holotransporter-Komplexe.

Die Funktion der N-Komponente ist noch ungeklärt. Zum einen könnte sie an der Beladung der Substratbindestelle der S-Einheiten beteiligt sein, wie dies in Abbildung 43 A dargestellt ist. Der lange periplasmatische Loop von NikN könnte beispielsweise durch Interaktionen mit dem konservierten N-Terminus von NikM dabei behilflich sein, den N-Terminus mit gebundenem Metallion im Inneren des Proteins zu positionieren. Dagegen spricht, dass *TtNikM2* in Abwesenheit von *TtNikN2* zur Substratbindung befähigt war (Yu *et al.* 2014). Allerdings wurde solubilisiertes *TtNikM2* während der Reinigung in der Gegenwart einer unnatürlich hohen Konzentration von entweder Kobalt- oder Nickelionen inkubiert, so dass eine Beteiligung von NikN an der Substratbeladung bei physiologischen Metallkonzentrationen nicht auszuschließen ist.

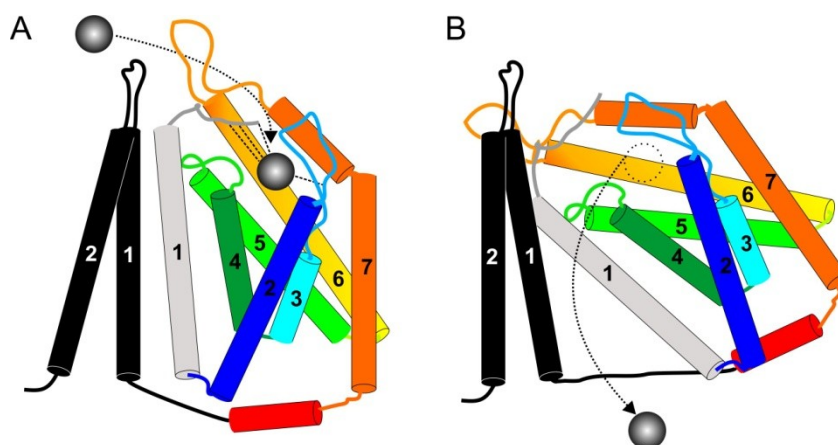


Abbildung 43: Die mögliche Funktion von NikN dargestellt in einem Modell von *RcNik(MN)*. NikM (graue und farbige Zylinder) wurde nach *TtNikM2* (PDB: 4m58) modelliert und ist über einen cytoplasmatischen, nicht maßstabsgetreuen Bereich von etwa 60 Aminosäuren mit NikN (schwarze Zylinder) verbunden. Die N-Komponente könnte (A) bei der Beladung der Substratbindestelle von NikM' mit dem Metallion (grauer Ball) oder (B) bei der Freisetzung des Substrats beteiligt sein. Gestrichelte Linien in A: quadratisch-planare Substratbindestelle, gestrichelte Pfeile: Nickelbindung oder Nickelfreisetzung.

Alternativ könnte die N-Komponente bei der Freisetzung des Substrats beteiligt sein, was in Abbildung 43 B dargestellt ist. In *TtNikM2* ist ebenso wie in den kristallisierten,

vitaminspezifischen S-Einheiten kein Transportkanal durch das Proteininnere zu erkennen (Yu *et al.* 2014). Ein Transportkanal zwischen der S-Einheit und der in den vitaminspezifischen Transportern nicht vorkommenden zusätzlichen N-Komponente ist aufgrund der nicht festen Interaktion von M und N unwahrscheinlich. Da NikM und CbiM in der Natur immer mit dem ECF-Modul interagieren, kann vermutet werden, dass NikM entsprechend der vitaminspezifischen S-Einheiten im Holotransporter (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014) ebenfalls eine quer zur T-Einheit liegende Position einnimmt. Die NikM- und CbiM-Proteine besitzen in der ersten sowie in der zweiten Transmembranhelix jeweils hydrophobe Aminosäuren wie Alanin und Valin, über die die Interaktion mit der T-Einheit möglich sein könnte.

Der Zugang zur Substratbindestelle der vitaminspezifischen S-Einheiten wird durch den deckelartigen Loop 1 reguliert (Majsnerowska *et al.* 2013, Zhang 2013, Slotboom 2014). Im Falle der metallspezifischen S-Einheiten wird die Substratbindestelle durch den in das Protein hineinragenden N-Terminus verschlossen. Die Freisetzung der Metallionen ist nur möglich, wenn der N-Terminus aus dem Inneren des Proteins entfernt wird, wodurch auch die Substratbindestelle destabilisiert wird. Eine kurzfristige Interaktion der N-Komponente mit der S-Einheit könnte für eine Beeinflussung des Wasserstoffbrückennetzes ausreichend sein. Die Folge wäre eine Destabilisierung der Position von His67 und des N-Terminus (Chivers 2015), wodurch der N-Terminus nicht länger die Substratbindestelle blockieren würde. Ob im Falle der metallspezifischen S-Einheiten der erste periplasmatische Loop ebenfalls an der Regulation der Zugänglichkeit der Substratbindestelle beteiligt ist, ist noch unklar. Aufklärung könnte eine metallfreie Struktur von NikM bei einer abweichenden Position des ersten extracytoplasmatischen Loop liefern.

Es ist noch ungeklärt, wie die Metallfreisetzung im Falle der in der Natur allein nicht vorkommenden, jedoch einzeln Nickel in die Zellen transportierenden Varianten RcCbiMN und RcNik(MN) erfolgt. Da bisher noch keine Oligomerisierung der metallspezifischen S-Einheiten beobachtet wurde, ist fraglich, wie die quer zur Membran orientierte Position der S-Einheit ohne ECF-Modul ermöglicht wird. Es ist eher unwahrscheinlich, dass die N-Komponente als aufrecht verbleibender Interaktionspartner die Funktion der T-Einheit übernehmen kann, da die N-Komponente nur kurzfristig mit der metallspezifischen S-Einheit interagiert. Im Falle der natürlichen (MN)-Fusion interagiert die N-Komponente vermutlich ebenfalls nur sporadisch mit der M-Komponente und ist nicht an der Stabilisierung eines Komplexes beteiligt. Möglicherweise könnte eine künstliche Tandemfusion der metallspezifischen S-Einheiten Aufschluss darüber geben, ob eine Dimerisierung der S-Einheit für die Transportfunktion nötig ist.

3.6 Der Oligomerzustand der T-Einheit

Für die S-Einheit BioY wurden sowohl monomere als auch oligomere Zustände nachgewiesen. Zur Stöchiometrie der zweiten membranständigen Untereinheit der ECF-Transporter gibt es ebenfalls unterschiedliche Befunde. Die T-Einheit ist die bisher am wenigsten erforschte Untereinheit der ECF-Transporter und bisher existieren nur drei Kristallstrukturen von der T-Einheit aus *L. brevis* (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Zwar konnten chemische Vernetzungsexperimente sowie Aminosäureaustausche die Interaktionsbereiche der T-Einheit mit den beiden anderen Untereinheiten eingrenzen (Neubauer *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2014). Der exakte Mechanismus, durch welchen die T-Einheit die durch ATP-Bindung induzierte Konformationsänderung der A-Einheiten mit dem Substrattransport koppelt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

In der Kristallstruktur wurde die T-Einheit als Monomer identifiziert, aber chemische Vernetzungsexperimente und „Pull-down“-Untersuchungen weisen darauf hin, dass ein Teil der T-Einheiten als Dimer vorkommen (Neubauer *et al.* 2011, Karpowich & Wang 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte die Dimerisierung der T-Einheit des Biotintransporters sowohl im Holotransporter als auch nur im Komplex mit den A-Einheiten bestätigt werden. *In vitro* enthielten mindestens 20 % der gereinigten Komplexe dimeres BioN. Die Quantifizierung der gereinigten Komplexe ergab für mindestens 20 % eine mögliche Stöchiometrie von zwei bis vier A-Einheiten, zwei T-Einheiten und zwei S-Einheiten. Dies entspricht einer Stöchiometrie, wie sie auch für andere ECF-Transporter *in vitro* nachgewiesen wurde (Karpowich & Wang 2013, ter Beek *et al.* 2011). Die restlichen maximal 80 % des gereinigten BioMNY-Holotransporters lagen *in vitro* vermutlich in einer A₁:A₁:T₁:S₁-Stöchiometrie vor, die der Stöchiometrie der drei kristallisierten ECF-Holotransporter entsprach (Wang *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Die Funktion der im Holotransporter sowie der in Abwesenheit von BioY auftretenden BioN-Dimere ist noch unklar. Die Oligomerisierung der T-Einheit scheint für den Transportvorgang nicht essentiell zu sein. In Nanodisks ist vermutlich der nach densitometrischer Analyse aus BioM₂NY bestehende Holotransporter ausreichend, um den Transportzyklus zu katalysieren, wie Untersuchungen zum Biotinbeladungszustand und zur Biotinfreisetzung zeigten (F. Finkenwirth, persönliche Mitteilung). Die Stöchiometrie des biotinspezifischen Holotransporters ist jedoch auch in Nanodisks noch nicht vollständig geklärt, da auch hier durch chemische Vernetzungsexperimente dimere S- bzw. T-Einheiten im Holotransporter nachgewiesen werden konnten (F. Finkenwirth, M. Grunzel, persönliche Mitteilung).

Der durch mehrere *in vitro*-Untersuchungen erbrachte Nachweis dimerer T-Einheiten in einem Teil der Transporterkomplexe (diese Arbeit, Neubauer *et al.* 2011, Karpowich & Wang 2013) deutet jedoch eine relevante Funktion der dimeren T-Einheiten im Komplex an, welche über die Weiterleitung der durch ATP-Bindung induzierten Konformationsänderungen von der A-Einheit auf die S-Einheit hinaus geht. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann jedoch nicht beantwortet werden, inwieweit die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Dimerisierung der S- und T-Einheiten einen dynamisch auftretenden Zustand während des Transportzyklus im Holotransporter repräsentiert.

4. Material und Methoden

4.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt. XL1 Blue wurde zur Klonierung und zur Analyse der Aufnahme radioaktiv markierter Metalle sowie zur Analyse der Ureaseaktivität verwendet. K12 UT5600 und BL21 dienten zur rekombinanten Produktion von Proteinen, S1039 zur Analyse der Aufnahme radioaktiven Biotins und BW25113 wurde für Wachstumstests unter biotinlimitierenden Bedingungen genutzt.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i>] (Tet ^R)	Stratagene
<i>E. coli</i> K12 UT5600	F' <i>ara-14 leuB6 secA6 lacY1 proC14 tsx-67 Δ(ompT-fepC)266 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> S1039	<i>birB13(Ts) Δbio-61 bioP98</i> (up promoter) <i>recA1 thi rpsL λb515 b519 galQ6 red-270 c1857</i>	Ketner & Campbell 1974
<i>E. coli</i> BL21	F' <i>Δlon ΔompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ gal endA Tet^R</i>	Novagene
<i>E. coli</i> BW25113	F' <i>Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514</i>	Datsenko & Wanner 2000

4.2 Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide aus Vorgängerarbeiten.

Name des Plasmides	Eigenschaften	Herkunft
pBluescript II KS+	Ap ^R <i>lacZ'</i> <i>lacI</i> -Promotor, ColE1 <i>ori</i>	Stratagene
pFDX500	Km ^R , <i>lacI^q</i> Derivat von pACYC177, p15A <i>ori</i>	Schnetz & Rak 1990a
pLacI-Rare2	Cm ^R , <i>lacI</i> Codon-Plus, p15A <i>ori</i>	Novagen
pGEM-T	<i>mCer</i> oder <i>mYFP</i> flankiert von <i>Bgl</i> III und <i>Nco</i> I 5'- und 3'-seitig	Promega
pKAU17	Ap ^R , <i>ureABCDEFG</i> von <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>lacI</i> -Promotor	Mulrooney <i>et al.</i> 1989

Fortsetzung Tabelle 3: Verwendete Plasmide aus Vorgängerarbeiten.

Name des Plasmides	Eigenschaften	Herkunft
pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> SB 1003 (Rc), FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Hebbeln <i>et al.</i> 2007
pRcBioY-HF (Sm)	Sm ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Finkenwirth 2009
pRcBioY-F	Ap ^R , <i>bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Hebbeln <i>et al.</i> 2007
pmYFP-RcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>mYFP</i> , <i>bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Finkenwirth <i>et al.</i> 2010
pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , <i>mCer</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Finkenwirth <i>et al.</i> 2010
pRcBioMNY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioMNY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Hebbeln <i>et al.</i> 2007
pRcBioMNY-HMF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioMN</i> , c-MYC, <i>bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Neubauer <i>et al.</i> 2011
pBjBioY _[K166R] -HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 (Bj) mit Mutation resultierend in K166R, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Finkenwirth <i>et al.</i> 2013
pL11BioY-HF/ pL12BioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> aus <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (L1, <i>bioY1</i> oder <i>bioY2</i>), FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Bekurtz 2011
pRcCbiMN-S pRcCbiMNQO-S	Ap ^R , <i>cbiMN</i> oder <i>cbiMNQO</i> aus <i>R. capsulatus</i> , StrepII, <i>lacI</i> -Promotor	Neubauer 2013
pRcCbiM-S pRcCbi(MN)-S pRcCbi(M _[H2D] N)-S pRcCbiM _[H2D] N-S	Ap ^R , <i>cbiM</i> oder fusioniertes <i>cbi(MN)</i> aus <i>R. capsulatus</i> , StrepII, <i>lacI</i> -Promotor Ap ^R , fusioniertes <i>cbi(M_[H2D]N)</i> oder unfusioniertes <i>cbiM_[H2D]N</i> aus <i>R. capsulatus</i> , StrepII, <i>lacI</i> -Promotor	Siche <i>et al.</i> 2010 Siche 2010
pRcCbi(M _[X] N)-S	Ap ^R , fusioniertes, mutiertes <i>cbi(M_[X]N)</i> aus <i>R. capsulatus</i> , StrepII, <i>lacI</i> -Promotor, X = M1M2, M1A2, H2D/Q/N/S/S, I3Δ, M4A/S/Δ, E5Δ, G6Δ, Y7Δ, L8Δ, P9Δ	Siche <i>et al.</i> 2010
pRcNik(MN)QO-F pRcNik(M _[H2Y] N)QO-F	Ap ^R , <i>nik(MN)QO</i> oder <i>nik(M_[H2Y]N)QO</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor	Rodionov <i>et al.</i> 2006
pRcNik(MN)	Ap ^R , <i>nik(MN)</i> aus <i>R. capsulatus</i> , <i>lacI</i> -Promotor	Hebbeln 2008

Tabelle 4: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide und ihre Eigenschaften.

Name des Plasmides	Derivat von	Eigenschaften
pXyBioY-HF	pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> (<i>NcoI/BglII</i>) aus <i>Xy</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor; <i>Xy</i> = <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (At), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 (Bj), <i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597 (Ob, <i>bioY2</i>), <i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009 (Rp), <i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114 (Rd), <i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3 (Sp, <i>bioY2</i>), <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (Sm), <i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM (Rn)
pOb1BioY-HF	pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY1</i> (<i>NcoI/BamHI</i>) aus <i>O. batsensis</i> HTCC2597, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pSp1BioY-HF	pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY1</i> (<i>PciI/BglII</i>) aus <i>S. pomeroyi</i> DSS-3, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRpPimA-HF	pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>pimA</i> (<i>PciI/BglII</i>) aus <i>R. palustris</i> CGA009 (Rp), FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcBioY _{D164N} -HF/ pRcBioY _{K167R} -HF/ pRcBioY _{K167Q} -HF	pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> mit Mutation resultierend in D164N, K167R oder K167Q, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcBioY-BioY-HF	pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY-bioY</i> (<i>BglII/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcBioY _{WT} -BioY _{D164N} / pRcBioY _{WT} -BioY _{K167R} / pRcBioY _{WT} -BioY _{K167Q}	pRcBioY _{D164N} -HF/ pRcBioY _{K167R} -HF/ pRcBioY _{K167Q} -HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY_{WT}-bioY_{Mut}</i> (<i>bioY_{WT}</i> über <i>NcoI/NcoI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> mit Mutation resultierend in D164N, K167R oder K167Q im C-terminalen BioY, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcBioY _{D164N} -BioY _{D164N} / pRcBioY _{K167R} -BioY _{K167R} / pRcBioY _{K167Q} -BioY _{K167Q}	pRcBioY _{D164N} -HF/ pRcBioY _{K167R} -HF/ pRcBioY _{K167Q} -HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY_{Mut}-bioY_{Mut}</i> (<i>bioY_{Mut}</i> über <i>NcoI/NcoI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> mit Mutation resultierend in D164N, K167R oder K167Q in beiden BioY-Domänen, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcBioY _{D164N} -BioY _{WT} / pRcBioY _{K167R} -BioY _{WT} / pRcBioY _{K167Q} -BioY _{WT}	pRcBioY _{D164N} -HF/ pRcBioY _{K167R} -HF/ pRcBioY _{K167Q} -HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY_{Mut}-bioY_{WT}</i> (<i>bioY_{WT}</i> über <i>BglII/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> mit Mutation resultierend in D164N, K167R oder K167Q im N-terminalen BioY, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pmYFP-RcBioY-BioY-HF	pRcBioY-BioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>mYFP</i> (<i>NcoI/NcoI</i>), <i>bioY-bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcBioY-BioY-HF (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , 10-fach His, <i>bioY-bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG (<i>bioY-bioY</i> und FLAG über <i>NcoI/XbaI</i>), <i>lacI</i> -Promotor
pRcBioY-F (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , <i>bioY</i> aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG (<i>bioY</i> und FLAG über <i>XhoI/BglII</i>), <i>lacI</i> -Promotor
pH-RcBioY	pRcBioY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioY</i> (<i>PvuII/PvuII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor

Fortsetzung Tabelle 4: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide und ihre Eigenschaften.

Name des Plasmides	Derivat von	Eigenschaften
pRcBioN-F (Sm)	pRcBioY-F (Sm)	Sm ^R , <i>bioN</i> (<i>NcoI/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pH-RcBioN	pH-RcBioY	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioN</i> (<i>NcoI/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , <i>lacI</i> -Promotor
pH-RcBioMN	pH-RcBioN	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioMN</i> (<i>XhoI/NdeI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , <i>lacI</i> -Promotor
pH-RcBioMNY	pRcBioMNY-HF	Ap ^R , 10-fach His, <i>bioMNY</i> (<i>bioY</i> über <i>KasI/XbaI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , <i>lacI</i> -Promotor
pRcCbiM-F (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , <i>cbiM</i> (<i>NsiI/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcCbiMN-F (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , <i>cbiMN</i> (<i>NsiI/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcCbiMNQO-F (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , <i>cbiMNQO</i> (<i>NsiI/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcCbiM _[H2D] N-F (Sm)	pRcCbiMN-F (Sm)	Sm ^R , <i>cbiM_[H2D]N</i> (<i>XhoI/EcoRI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcNik(MN)-F	pRcNik(MN)QO-F	Ap ^R , <i>nik(MN)</i> (<i>NsiI/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcNik(MN)-F (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , <i>nik(MN)</i> (<i>NsiI/BglII</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG <i>lacI</i> -Promotor
pRcNik(MN)QO-F (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , <i>nik(MN)QO</i> (<i>NsiI/XbaI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcNik(M _[H2Y] N)-F	pRcNik(MN)-F	Ap ^R , <i>nik(M_[H2Y]N)</i> (<i>XhoI/NcoI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcNik(M _[H2Y] N)-F (Sm)	pRcBioY-mCer-HF (Sm)	Sm ^R , <i>nik(M_[H2Y]N)</i> (<i>XhoI/NcoI</i>) aus <i>R. capsulatus</i> , FLAG, <i>lacI</i> -Promotor
pRcNik(M _[X] N)QO-F	pRcNik(MN)QO-F	Ap ^R , <i>nikM</i> -Bereich aus <i>R. capsulatus</i> mit Mutageneseprimern amplifiziert und über <i>NsiI/NcoI</i> oder <i>NcoI/SfiI</i> in Ausgangsvektor kloniert, X = A48W; T65A; H67A; G70A; G79A/P; Q94E; D100N; H194A/E/Q; E202N/Q/D/A; T206V/A, FLAG, <i>lacI</i> -Promotor

4.3 Konstruktionsbeschreibung verwendeter Plasmide

Als Ausgangspunkt für alle Klonierungen diene pRcBioY-HF – eine Variante des pBluescript II KS+ mit durch das *bla*-Genprodukt vermittelter Ampicillin-Resistenz. Das für *R. capsulatus* BioY codierende Gen *bioY* wird flankiert von den Schnittstellen *NcoI* und *BglII* und steht unter der Kontrolle des *lacI*-Promotors (Hebbeln *et al.* 2007). Die Sequenz des Met1-Codons

von *bioY* überschneidet sich mit der Sequenz für die Restriktionsschnittstelle *NcoI* und ist bedingt durch die *NcoI*-Erkennungsstelle zusätzlich durch drei Basenpaare von der 5'-seitigen Sequenz, die für einen 10-fach His-tag codiert, getrennt. An das letzte Codon des *bioY* schließt sich die *BglII*-Erkennungssequenz an, bevor unmittelbar darauf die FLAG-codierende Sequenz und ein Stop-Codon den *Open-Reading-Frame* (ORF) abschließen. Die Proteinsequenz von BioY beginnt somit N-terminal mit zehnmal Histidin, gefolgt von einem Serin, und wird C-terminal um ein Arginin und ein Serin erweitert, bevor der FLAG-tag (DYKDDDDK) folgt.

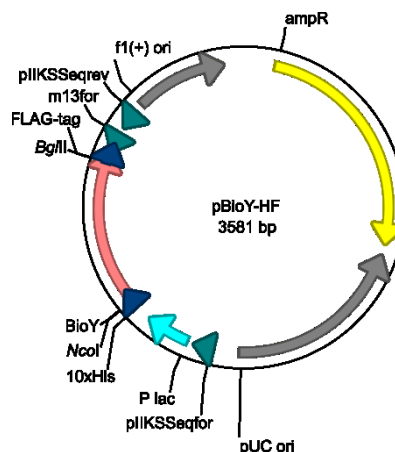


Abbildung 44: Plasmidkarte von pRcBioY-HF. Der Vektor ist ein Derivat des pBluescript II KS+ mit für Ampicillin-Resistenz codierendem *bla*-Gen, *lacI*-Promotor und dadurch kontrolliertem *bioY*. Das vom 10-fach His-tag und FLAG-tag flankierte *bioY*-Gen wurde mittels der Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BglII* kloniert. f1(+) ori, pUC ori: Origin of Replication (grau), ampR: *bla* Ampicillin-Resistenz (gelb), Primererkennungssequenzen for: vorwärts und rev: rückwärts (türkis), 10-fach His-tag und FLAG-tag (blau), P lac: *lacI*-Promotor (hellblau), BioY: *bioY* (rosa).

4.3.1 Klonierung verschiedener Gene aus anderen Organismen in den *E. coli*-Vektor pBluescript II KS+

Zusätzlich zu *bioY* und *bioMNY* von *R. capsulatus* (Hebbeln *et al.* 2007) wurden weitere BioY-codierende Gene aus anderen Organismen genutzt. Die Gene und deren Ursprung sowie die Proteininformationen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Primer zur Amplifikation der 12 zu klonierenden Gene sind in Kapitel 4.12 in Tabelle 7 (#1 bis #24) enthalten. Um die Gene in das Ausgangsplasmid pRcBioY-HF einfügen zu können, enthielten die Primer zusätzlich die Erkennungssequenzen entweder für *NcoI* oder für *BglII*. Für den Fall, dass eines der beiden Enzyme innerhalb des zu klonierenden Gens ebenfalls eine Erkennungssequenz besaß (wie zum Beispiel *bioY1* von *O. batsensis* mit einer *BglII*-Schnittstelle oder *bioY1* von *S. pomeroyi* mit *NcoI*), wurde *NcoI* durch das kompatible *PciI* und *BglII* durch *BamHI* ersetzt. Die PCR-

Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt, während das Vektorrückgrat pRcBioY-HF mit *NcoI* und *BglII* vom Insert getrennt wurde. Bei der Klonierung des Zielgens mittels *PciI/NcoI* oder *BamHI/BglII* gingen die entsprechenden Schnittstellen im Zielvektor verloren.

Das Gen *pimA* aus *R. palustris*, welches für die Pimelat:Coenzym-A Ligase codierte und für die Herstellung einer biotinauxotrophen und transportdefizienten Mutante benötigt wurde, wurde in gleicher Weise mit *PciI* und *BglII* in den Vektor kloniert. Die genutzten Primer sind #25 und #26 in Tabelle 7.

Tabelle 5: Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten *bioY* Gene sowie UniProt-Nummer und Größe der codierten Proteine.

Stamm (Abkürzung)	Genort	ECF-Typ	UniProt-Nr.	Proteingröße
<i>Rhodobacter capsulatus</i> SB 1003 (Rc)	RCAP_rcc03249	I	D5ARG8	190 AS
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (At)	Atu0749	I	A9CJY4	187 AS
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 (Bj)	blr4297	ohne AAT	Q89M96	185 AS
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (Li)	llmg_1964	II	A2RMJ9	189 AS
	llmg_0332		A2RI45	182 AS
<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597 (Ob)	OB2597_17167	ohne AAT	A3TZI7	175 AS
	OB2597_04098		A3U2L6	201 AS
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009 (Rp)	RPA2447	ohne AAT	Q6N716	205 AS
<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114 (Rd)	RD1_2561	ohne AAT	Q166H5	201 AS
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM (Rn)	ISM_15365	ohne AAT	A3SP67	178 AS
<i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3 (Sp)	SPO2302	ohne AAT	Q5LR30	195 AS
	SPO3339		Q5LN73	195 AS
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (Sm)	SMcf00964	I	Q92RI3	187 AS

4.3.2 Konstruktion einer RcBioY-BioY-Tandem-Fusion

Das Ziel dieser Klonierung war eine Kopf-an-Schwanz-orientierte Tandem-Fusion des RcBioY-Proteins. Um dies zu erreichen, wurde das codierende *bioY* mit den Primern #27 und #76 (Tabelle 7) amplifiziert, wodurch sowohl 5'-seitig als auch 3'-seitig eine *BglII*-Erkennungssequenz angefügt wurde. Dadurch konnte das Fragment in den mit *BglII* behandelten Ausgangsvektor pRcBioY-HF unmittelbar 3'-seitig der ersten *bioY*-Kopie eingefügt werden. Die korrekte Orientierung des Fragments wurde mittels Restriktionsanalyse kontrolliert. Das resultierende künstliche BioY-Dimer trägt an der ersten Domäne N-terminal den 10-fach His-tag und an der zweiten Hälfte C-terminal den FLAG-tag. Beide Hälften

werden bedingt durch die *Bgl*II-Schnittstelle in der codierenden Sequenz durch Arginin und Serin getrennt.

4.3.3 Konstruktion der inaktivierten *RcBioY*-Varianten D164N, K167R und K167Q

Der Zielbereich der Mutagenese befindet sich in der sechsten Transmembranhelix des *RcBioY*, genauer an den für Aspartat 164 und Lysin 167 codierenden Positionen. Für die Mutagenese wurde zuerst eine PCR mit dem plasmidinternen Primer m13for (#68) und geninternen Mutagenesevorwärtsprimer (#28 bis #30, siehe Tabelle 7) durchgeführt. Die abgeänderte Nukleotidfolge wurde im Mutageneseprimer 5'- und 3'-seitig von jeweils 15 Basenbaaren flankiert. Das aus dieser PCR resultierende Fragment wurde als Rückwärtsprimer für eine zweite PCR genutzt. Als Vorwärtsprimer diente *RcBioY*-*Sfi*I-for (#31), welcher mittig in *bioY* band und die vorhandene *Sfi*I Schnittstelle überlappte. Dieses PCR-Produkt wurde nun mit *Sfi*I und *Xba*I behandelt. Diese Restriktionsschnittstellen folgen unmittelbar auf die FLAG-tag codierende Sequenz und des Stop-Codon. Das resultierende Fragment wurde in das ebenso verdaute Ausgangsplasmid p*RcBioY*-HF eingefügt. Die Mutation wurde durch Restriktionsanalyse sowie Sequenzierung bestätigt.

4.3.4 Konstruktion von *RcBioY*-*BioY*-Tandem-Fusionen mit einer oder zwei inaktivierten Domänen

Die Aminosäureaustausche D164N, K167R und K167Q wurden entweder in die N-terminale oder die C-terminale oder in beide Domänen des *BioY*-*BioY*-Fusionsproteins eingebracht. Dazu wurde das Wildtyp-*bioY* (*bioY*_{Wt}) oder das mutierte *bioY* (*bioY*_{Mutante}) entweder mit den Primern *RcBioY*-*Nco*Ifor (#77) und *RcBioY*-*Nco*Irev (#32) oder mit den Primern *RcBioY*-*Bgl*IIfor (#27) und *RcBioY*-*Bgl*IIrev (#76) amplifiziert, um an beiden Seiten die Erkennungssequenzen für entweder *Nco*I oder *Bgl*II anzufügen. *Nco*I-flankierte Gene wurden N-terminal an *bioY*_{Mutante} kloniert, um *bioY*_{Wt}-*bioY*_{Mutante} und *bioY*_{Mutante}-*bioY*_{Mutante} zu erhalten. *Bgl*II-flankiertes *bioY*_{Wt} wurde entsprechend C-terminal zur Konstruktion von *bioY*_{Mutante}-*bioY*_{Wt} ligiert.

4.3.5 Konstruktion von mYFP-Fusionsvarianten

Entsprechend Finkenwirth et al. (2010) wurde zur Konstruktion von Genen, die für Fusionsproteine mit N- oder C-terminalem, monomerem, gelb-fluoreszierendem (mYFP)-Protein codierten, eine Klonierungskassette genutzt. Diese bestand aus dem Gen für das

Fluoreszenzprotein, das jeweils 5'- und 3'-seitig in gleicher Reihenfolge von den Erkennungssequenzen für *Bgl*II und *Nco*I flankiert wurde. Somit konnte durch Restriktionsverdau mit *Nco*I eine 5'-seitige Fusion mit einem beliebigen Gen erreicht werden und durch Verdau mit *Bgl*II eine 3'-seitige Fusion. In dieser Arbeit wurden N-terminal mit mYFP fusionierte BioY-Varianten genutzt.

4.3.6 Konstruktion von BioY ohne FLAG-tag (pH-RcBioY)

Für parallele Expression verschiedener Gene und einen getrennten Nachweis der Proteine stand bisher das Ausgangsplasmid pRcBioY-HF, dessen Vorgänger pRcBioY-F (Hebbeln *et al.* 2007) sowie das Plasmid pRcBioMNY-HF zur Verfügung. Je nach eingefügtem Gen oder Operon ist BioY mit einem FLAG-tag oder zusätzlich noch mit einem His-tag versehen. Im Falle des BioMNY trägt BioM den N-terminalen His-tag und BioY den C-terminalen FLAG-tag. Bei Codierung verschiedener BioY-Proteine auf unterschiedlichen Plasmiden innerhalb eines *E. coli*-Stamms musste es möglich sein, die Proteine über ihren Tag zu unterscheiden. Daher wurde ein Vektor konstruiert, welcher *bioY* mit der 5'-seitigen 10-fach His-Sequenz enthielt, aber 3'-seitig mit der *Bgl*II-Erkennungssequenz und einem Stop-Codon abschloss. Hierdurch war weiterhin eine Klonierung neuer Gene über *Nco*I und *Bgl*II in diesen Vektor möglich.

Die Klonierung erfolgte mit dem In-Fusion[®]HD-Kit der Firma Clontech, welches die Klonierung eines oder mehrerer PCR-Fragmente in einen linearisierten Vektor in einem Schritt ermöglicht. Die Klonierung erfolgte mittels des mitgelieferten In-Fusion Enzyms, welches über die Erkennung von 15 Basenpaaren komplementär zum Einbauort das Insert einfügen kann. In Abbildung 45 ist die Klonierungsstrategie illustriert. Für das Vektorrückgrat wurde das Ausgangsplasmid pRcBioY-HF mit *Pvu*II in drei Fragmente gespalten. Das größte Fragment inklusive der Genkassette für die Ampicillin-Resistenz wurde als Vektorrückgrat genutzt (Vektor). Mit den Primern #34 pIIKS-*Xba*I-for und #33 BioY-*Sfi*I-rev wurde das Fragment I amplifiziert. Primer #34 war unmittelbar 5'-seitig des *lac*I-Promotors lokalisiert und mutierte sechs Basenpaare zu einer neuen Erkennungssequenz für *Xba*I unmittelbar folgend auf die vorhandene *Pvu*II-Schnittstelle. Fragment II wurde mit den Primern #31 RcBioY-*Sfi*I-for und #35 BioY-*Pvu*II-rev erhalten. Dadurch wurde die FLAG-tag-Sequenz sowie der darauffolgende Bereich inklusive m13for-Primer (#68) durch ein Stop-Codon und eine *Xba*I-Erkennungssequenz ersetzt und endete an der *Pvu*II-Region des Ausgangsvektors. Fragment I und II überlappten sich somit intern in *bioY* im Bereich der *Sfi*I-Region und beide Fragmente überlappten mit dem Vektorrückgrat an der entsprechenden *Pvu*II-Schnittstelle, so

dass die Ligation in einem Schritt möglich war. Die Primer sind in Tabelle 7 in Kapitel 4.12 aufgeführt.

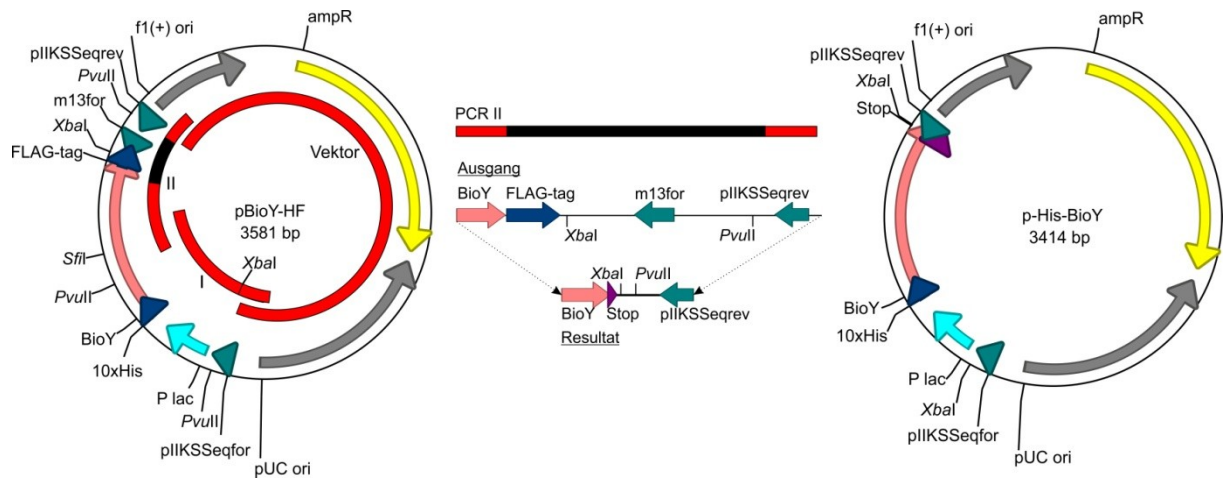


Abbildung 45: Plasmidkonstruktion pH-RcBioY ohne FLAG-tag (p-His-BioY). Als Ausgangsplasmid wurde pRcBioY-HF mit singularer *Xba*I und dreimaliger *Pvu*II-Schnittstelle genutzt (links). Das Vektorrückrat (Vektor) wurde durch *Pvu*II-Verdau gewonnen. PCR-Fragment I erhielt eine neue *Xba*I-Erkennungssequenz und in PCR-Fragment II wurde durch die Amplifikation der FLAG-tag sowie der Bereich bis zur m13for-Primersequenz durch ein Stop-Codon und eine *Xba*I-Schnittstelle ersetzt (mitte). Der mit dem Ausgangsplasmid übereinstimmende Bereich ist rot dargestellt, der abweichende Bereich schwarz. Nach erfolgreicher Ligation mit dem In-Fusion®HD-Kit besitzt das resultierende Plasmid (rechts) eine neue *Xba*I-Erkennungssequenz unmittelbar 3'-seitig der *Pvu*II-Schnittstelle stromaufwärts des *lac*I-Promotors und das codierte BioY besitzt einen 10-fach His-tag aber keinen FLAG-tag. fl(+) ori, pUC ori: Origin of Replication (grau), ampR: *bla* Ampicillin-Resistenz (gelb), Primererkennungssequenzen for-vorwärts und rev-rückwärts (türkis), 10-fach His-tag und FLAG-tag (blau), P lac: *lac*I-Promotor (hellblau), BioY: *bio*Y (rosa).

Das resultierende Plasmid rechts in Abbildung 45 ermöglicht neben der Klonierung von Genen über *Nco*I und *Bgl*II, wie beispielsweise *bio*N, auch die Entfernung des kompletten Gens inklusive *lac*I-Promotor mittels *Xba*I. Dieser Bereich könnte zum Beispiel in das Ausgangsplasmid pBioY-HF in die dort nur singular vorkommende *Xba*I-Schnittstelle integriert werden, wodurch auch eine getrennte Expression zweier Gene auf einem Plasmid möglich wäre.

4.3.7 Konstruktion der Plasmide pH-RcBioN, pH-RcBioMN und pH-RcBioMNY jeweils ohne FLAG-tag

Ausgehend von dem neu konstruierten Plasmid pH-RcBioY ohne FLAG-tag wurden auch die anderen Bio-Gene *bio*M und *bio*N in dieses Konstrukt eingefügt, damit eine Koproduktion von unterschiedlich getaggt, auf verschiedenen Plasmiden codierten Proteinen möglich war. Für

pH-RcBioN wurde *bioN* mit den Primern #36 und #37 amplifiziert und über *NcoI* und *BglII* in pH-RcBioY kloniert. Die Gene *bioM* bzw. *bioN* wurden zusammen mit der Sequenz für den 10-fach His-tag über das plasmidständige *XhoI* und das in *bioN* befindliche *NdeI* aus pRcBioMNY-HF ausgeschnitten und in das mit *XhoI* und *NdeI* behandelte pH-BioN eingefügt, um pH-RcBioMN ohne FLAG-tag zu erhalten. Die Klonierung von pH-RcBioMNY erfolgte durch die Behandlung von pH-RcBioY mit *KasI* und *XbaI*. Das resultierende 116 bp-lange Fragment mit dem hinteren Bereich des *bioY* sowie dem direkt anschließenden Stop-Codon ersetzt nach Klonierung in das Ausgangsplasmid pRcBioMNY-HF die Sequenz für den FLAG-tag.

4.3.8 Konstruktion der Plasmide pRcNik(MN)-F sowie pRcNik(M_[H2Y]N)-F

Für die Untersuchung der minimalen Transporteinheit der Metalltransporter mussten verkürzte Varianten des Nickeltransporters konstruiert werden. Ausgehend von der vorhandenen, verkürzten Variante Nik(MN), welche jedoch ohne FLAG-tag und ohne 3'-seitige flankierende Schnittstelle im Plasmid vorhanden war (Hebbeln 2008), wurde eine Amplifikation von *nik(MN)* mit den Primern #66 und #67 durchgeführt. Dadurch wurde 5'-seitig eine *NsiI*- und 3'-seitig eine *BglII*-Schnittstelle angefügt sowie das Stop-Codon entfernt. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pRcNik(MN)QO-F (Rodionov *et al.* 2006), welcher mit *NsiI* und *BglII* behandelt wurde, eingefügt und es wurde das Plasmid pRcNik(MN)-F erhalten.

Aus dem Vektor pRcNik(M_[H2Y]N)QO-F (Rodionov *et al.* 2006) wurde mit *XhoI* und *NcoI* der 5'-seitige Bereich von *nik(M_[H2Y]N)* ausgeschnitten und in das ebenso behandelte Plasmid pRcNik(MN)-F eingefügt, um pRcNik(M_[H2Y]N)-F zu generieren.

4.3.9 Konstruktion von Plasmiden mit Streptomycin-Resistenz und ohne His-tag

Für die Koproduktion von Proteinen wurden diese auf verschiedenen Plasmiden codiert, für deren Selektion in einem rekombinanten *E. coli*-Stamm verschiedene Antibiotika-Resistenzen nötig waren. In Finkenwirth *et al.* (2010) wurden beispielsweise alle mYFP-Fusionsproteine auf Plasmiden mit *bla* für Ampicillin-Resistenz codiert, während alle mCer-Fusionsproteine auf Plasmiden codiert wurden, welche das Streptomycin-Resistenz vermittelnde Gen *aapA*-enthielten. Ein aus der Arbeit von F. Finkenwirth stammendes Konstrukt (pRcBioY-mCer-HF (Sm)) war Ausgangspunkt für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide mit Streptomycin-Resistenz-Gen. Die Tandemfusion *bioY-bioY* wurde über *NcoI* und *XbaI* aus pRcBioY-BioY-HF isoliert und in pRcBioY-mCer-HF (Sm) integriert. Dabei wurde mCer entfernt. Über die Restriktionsenzyme *XhoI* und *BglII* wurde *bioY* inklusive der Sequenz für

den FLAG-tag aus pRcBioY-F (Hebbeln *et al.* 2007) ausgeschnitten und ersetzte den kompletten 10-fach His-tag/*bioY/mCer*-Bereich im Ausgangsplasmid. Es entstand pRcBioY-F (Sm).

Durch Amplifizierung von *bioN* mit den Primern #36 und #37 mit flankierendem 5'-seitigem *NcoI* und 3'-seitigem *BglII* konnte das PCR-Produkt nach Restriktionsverdau in pRcBioY-F (Sm) integriert werden und ergab pRcBioN-F (Sm).

Die für verschiedene Untereinheiten der Metalltransporter codierenden Plasmide wurden erhalten, indem die Genkassetten durch *NsiI* und *BglII* ausgeschnitten und in den gleichermaßen behandelten Ausgangsvektor pRcBioY-mCer-HF (Sm) eingefügt wurden. Die resultierenden Plasmide sind pRcCbiM-F (Sm), pRcCbiMN-F (Sm), pRcCbiMNQO-F (Sm), pRcNik(MN)-F (Sm), sowie pRcNik(MN)QO-F (Sm), wobei letzteres mit *NsiI* und *XbaI* kloniert wurde.

Da der Austausch des His2-Codons in *cbiM* und *nik(MN)* die *NsiI*-Erkennungsstelle entfernt, wurden pRcCbiM_[H2D]N-F (Sm) sowie pRcNik(M_[H2Y]N)-F (Sm) anders kloniert. Der 5'-seitige Bereich des RcCbiM_[H2D]N wurde mittels *XhoI/EcoRI* aus dem Plasmid pRcCbiM_[H2D]N-S (Siche 2010) isoliert und in pRcBioY-mCer-HF (Sm) eingefügt. Der 5'-seitige Bereich des RcNik(M_[H2Y]N) wurde mittels *XhoI/NcoI* aus dem Plasmid pRcNik(M_[H2Y]N)QO-F (Rodionov *et al.* 2006) isoliert und in pRcBioY-mCer-HF (Sm) eingefügt.

4.3.10 Konstruktion der RcNik(MN)QO-Varianten mit verändertem NikM

Der Ausgangspunkt für alle NikM-betreffenden Klonierungen war das in Rodionov *et al.* (2006) beschriebene Plasmid mit dem kompletten Operon *nik(MN)QO* unter der Kontrolle des *lacI*-Promotors und mit einer Gensequenz, welche für einen C-terminalen FLAG-tag codierte. Das Plasmid war ein pBluscript II KS+ Derivat und enthielt das *bla*-Gen für die Ampicillin-Resistenz. Das Operon des Nickeltransporters wurde 5'-seitig von der Restriktionsschnittstelle *NsiI* flankiert, die mit dem Start-Codon überlappte. Es wurden insgesamt 20 Aminosäuren in NikM' ausgetauscht, welche sich an 12 verschiedenen Positionen befanden. Die Orte für die Mutationen befanden sich zum einen relativ weit 5'-seitig innerhalb *nikM'* vor einer intrinsischen *NcoI*-Schnittstelle, zum anderen zwischen dieser *NcoI*- und einer weiter 3'-seitig lokalisierten *SfiI*-Schnittstelle. In Abbildung 46 ist der ORF von *nikMN* mit den für die Klonierung relevanten Schnittstellen rot abgebildet. Die zu mutierenden Codons sind in Form ihrer resultierenden Aminosäuren und deren Position im Protein Nik(MN) angegeben.

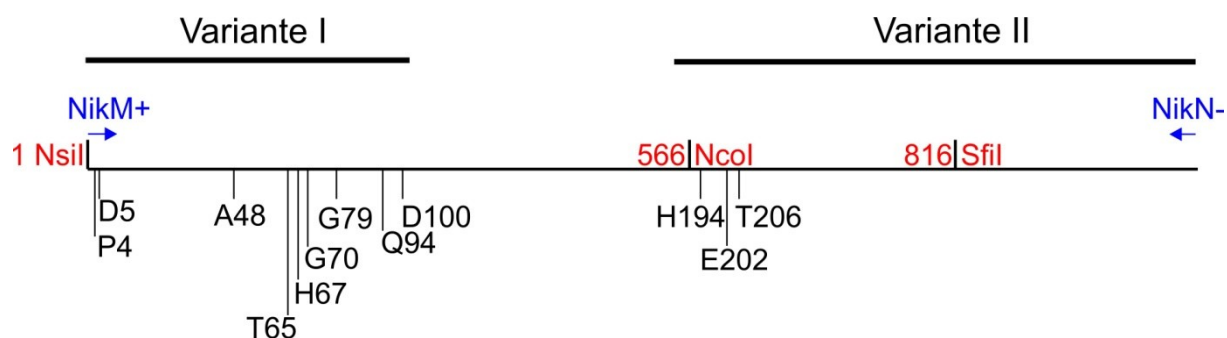


Abbildung 46: Schematische Darstellung des *nik(MN)*-Genbereiches mit den Aminosäurepositionen der zu mutierenden Codons im Protein Nik(MN). Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen *NsiI*, *NcoI* und *SfiI* sind rot markiert und ihre Position im Gen ist angegeben. Alle 12 zu mutierenden Codons sind in Form der finalen Aminosäureposition im Protein mit Strichen nach unten angegeben. Die blau markierten Primer *NikM(+)* und *NikN(-)* wurden für alle Klonierungen genutzt. Die Mutagenese-Primer waren für die Klonierung nach Variante I rückwärts orientiert und für Variante II vorwärts. Die genaue Klonierungsstrategie ist im Text beschrieben.

Die meisten Mutationen wurden über eine 3-Primer-Strategie konstruiert, bei der die beiden *nik(MN)*-flankierenden Primer #66 *NikM(+)* und #67 *NikN(-)* sowie ein mindestens 30 bp langer Mutageneseprimer, welcher mittig das zu mutierende Codon trug, genutzt wurden. Die Primer #38 bis #65 sind in Tabelle 7 aufgelistet. Dabei erfolgte die erste PCR-Runde für die 5'-seitigen zu mutierenden Codons mit einem Mutagenese-Rückwärtsprimer und *NikM(+)* (Variante I). Das erhaltene etwa 150-250 bp lange Fragment diente dann zusammen mit *NikM(-)* in einer zweiten PCR als Primer zur Amplifikation des kompletten Genbereiches von 1200 bp. Das Produkt wurde mit *NsiI* und *NcoI* verdaut und in den Vektor integriert. Die weiter 3'-seitig orientierten Mutationen wurden durch die gleiche Methode, jedoch mit einem Mutagenesevorwärtsprimer in der ersten PCR-Runde amplifiziert. Anschließend erfolgte ebenfalls eine zweite PCR mit dem Produkt aus PCRI als neuem Primer zusammen mit *NikM(+)*. Der Restriktionsverdau erfolgte mit *NcoI* und *SfiI* und das 250 bp große Fragment wurde in den ebenso verdauten Vektor pRcNik(MN)QO ligiert.

4.4 Nährmedien und Antibiotika

Luria-Bertani (LB)-Medium, Vollmedium

- 1 % (w/v) Trypton
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
- 0,25 % (w/v) NaCl
- 1,2 % (w/v) Agar (Zugabe bei festen Nährböden)

GN-Medium (Minimalmedium)

25 mM	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O
11 mM	KH ₂ PO ₄
20 mM	D-Glucose
37,5 mM	NH ₄ Cl
68 µM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
810 µM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
18,5 µM	FeCl ₃ x 6H ₂ O (in 0,1M HCl; sterilfiltriert)

pH 7,0; alle Komponenten einzeln autoklaviert

Zur Anzucht von K12UT 5600 wurde zusätzlich Leucin (40 µg/ml), Tryptophan (40 µg/ml), Prolin (40 µg/ml), Thiaminhydrochlorid (30µM) und Zink-(II)-Chlorid (1µM) zugesetzt. Zur Anzucht von BW25113 und davon abgeleiteter rekombinanter *E. coli*-Stämme wurde abhängig von der Fragestellung Pimelat (3mM) und Biotin (1nM bis 5µM) zum Flüssigmedium oder direkt in die Platten zugesetzt.

TY-Medium (Anzucht von *S. meliloti* 1021)

0,5 % Trypton; 0,3 % Hefeextrakt und 0,04% CaCl₂, pH mit H₃PO₄ auf 6,8

Bacto Marine Broth DIFCO 2216 (Anzucht von *O. batsensis* HTCC2597)

0,5 % Bacto Pepton; 0,1 % Bacto Hefeextrakt; 0,01 % Fe(III)Citrat; 1,945 % NaCl; 0,59 % MgCl₂; 0,324 % Na₂SO₄; 0,18 % CaCl₂; 0,055 % KCl; 0,016 % Na₂CO₃; 0,008 % KBr; 0,0034 % SrCl₂; 0,0022 % H₃BO₃; 0,0004 % Na-Silicate; 0,00024 % NaF; 0,00016 % (NH₄)NO₃; 0,0008 % Na₂HPO₄, pH 7,6

Zur Selektion der Resistenzmarker wurden Antibiotika nach Sambrook & Russell 2001 in der in Tabelle 6 aufgeführten Konzentration eingesetzt.

Tabelle 6: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % (v/v) EtOH	5 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in 96 % (v/v) EtOH	34 µg/ml

4.5 Zellanzucht

E. coli-Stämme in Flüssigkulturen wurden in LB- oder Minimalmedium unter Zugabe der zur Selektion benötigten Antibiotika in Erlenmeyerkolben in einem Kulturvolumen von 10 bis 20 ml bei 37 °C im Schüttelwasserbad bei 180 rpm inkubiert. Zellen zur Gewinnung von Protein wurden in Kulturvolumina von 500 ml bis 2 l bei 37 °C mit 150 rpm geschüttelt (New Brunswick Scientific Innova 43R Inkubator Shaker). Vorkulturen wurden von Einzelkolonien angeimpft. Hauptkulturen wurden mit 1-2 % (v/v) einer spätlogarithmischen Vorkultur oder mit definierter OD₅₇₈ von 0,1 überimpft. Zur Induktion der durch einen *lacI*-Promotor kontrollierten Gene wurde 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) direkt bei der Anzucht oder nach circa 2 h Wachstum zugesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte abhängig von der Fragestellung bei OD₅₇₈ von 1 bis 2,5 oder nach 24 h Anzucht.

4.6 Wachstumsanalysen

Für die Wachstumsuntersuchungen von *E. coli*-Stämmen wurde der biotindefiziente *ΔyigM ΔbioH::Km*-Referenzstamm mit den rekombinant produzierten BioY-Varianten in GN-Medium über 24 Stunden unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin sowie 1 µM Biotin bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 35 mM Na/K-Phosphatpuffer (25 mM Na₂HPO₄, 11 mM KH₂PO₄, pH 7,0) gewaschen, 1:200 in biotinfreiem GN-Medium verdünnt und erneut für 24 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden in GN-Medium mit 0,5 mM IPTG auf eine OD₅₇₈ von 0,05 verdünnt und 200 µl dieser Lösung wurden in sterile 96-Well-Microtiterplatten gegeben. Das Wachstum wurde bei einer OD₆₀₀ in einem Microtiter-Plattenlesegerät (SpectraMax M2, Molecular Devices) bei 37 °C für 15-20 Stunden analysiert.

4.7 Glycerinkulturen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der rekombinanten Zellen wurden Übernachtskulturen in einer 25 %-igen Glycerinlösung bei -80 °C gelagert.

4.8 DNA-Präparation

4.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA im Schnellverfahren nach Sambrook & Russell (2001)

Zur schnellen Untersuchung von klonierten Fragmenten in *E. coli* wurde diese Methode angewendet. Entweder wurden 1,5 ml Kulturvolumen einer 20 ml Übernachtskultur in einer Microfuge (Heraeus Biofuge Primo) bei 15000 rpm für eine Minute abzentrifugiert oder Zellmaterial wurde mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte abgenommen. Die Zellen wurden in einem Reaktionsgefäß in 100 µl eiskalter Lösung I (25 mM Tris, 10 mM EDTA x 2H₂O, 50 mM Glucose, 0,5 mg/ml RNase, pH 8,0) resuspendiert und circa fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v)), Invertieren und fünfminütiger Inkubation auf Eis. Die Proteine und Zelltrümmer wurden mittels Vermischung des Lysats mit 150 µl eiskalter Lösung III (3 M Kaliumacetat, pH 4,8 mit Essigsäure) durch Invertieren ausgefällt. Nach Inkubation auf Eis für mindestens fünf Minuten wurden die Zelltrümmer bei 15000 rpm für 10 bis 20 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 800 µl eiskaltem 96 %-igem (v/v) Ethanol vermischt und die DNA wurde bei 15000 rpm für 20 Minuten gefällt. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das DNA-Pellet mit 70 %-igem (v/v) EtOH gewaschen und erneut abzentrifugiert (10 min, 15000 rpm). Das Pellet wurde nach dem Trocknen mit 50 µl sterilem, bidestilliertem H₂O gelöst.

4.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe eines Präparations-Kits

Von einer 10 ml *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden 1,5 bis 2 ml Kulturvolumen mit einer Microfuge bei 15000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden nach dem Protokoll des Präparations-Kits der Firma Invitex (Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two) mit 250 µl Lösung A, 250 µl Lösung B und 250 µl Lösung C resuspendiert und lysiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 15000 rpm erfolgte der Transfer des Plasmid-DNA-haltigen Überstands auf die zugehörigen Säulchen. Nach Adsorption der DNA an die Membran der Säule konnte mit 750 µl Waschpuffer die DNA gereinigt und anschließend mit 50-75 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert werden. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte basierend auf der Absorption der DNA bei 260 nm mit dem PEQLAB NanoDrop Spectrophotometer ND-1000.

4.8.3 Isolierung von genomischer DNA, modifiziert nach Sambrook & Russell (2001)

Nach Anzucht der Bakterien in den entsprechenden Anzuchtmedien über Nacht wurden 4 ml Zellvolumen fünf Minuten bei 3800 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen und anschließend in 300 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 10 %-igem (w/v) SDS sowie 80 µl ProteinaseK (5 mg/ml) erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Anschließend wurde die Viskosität mit einer 2 ml Spritze (0,6 mm Kanüledurchmesser) durch mehrmaliges Aufziehen verringert. Die DNA wurde mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; v/v) durch Vortexen und dreiminütiges Zentrifugieren bei 15000 rpm gewaschen und befand sich nun in der oberen Phase. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 200 mM NaCl und dem 2,5-fachen Volumen an 96 %-igem (v/v) EtOH. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 15000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 70 %-igem (v/v) EtOH gewaschen, bei 60 °C getrocknet und in Wasser resuspendiert.

4.9 Enzymatische Modifikation von DNA

4.9.1 Restriktion

Die enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen der Firma NEB erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen und mit den mitgelieferten Puffern in 20-60 µl Gesamtvolumen. Abhängig von der Fragestellung wurden unterschiedliche Mengen an DNA verdaut. Dabei wurden 5-20 Units (U) Enzym (Enzymvolumen maximal ein Zehntel des Gesamtvolumens) zugesetzt, wobei 1 U als die Aktivität definiert ist, die unter optimalen Bedingungen 1 µg Lambda-Phagen-DNA vollständig verdaut. Bei Verdau der DNA mit zwei Enzymen wurden die Pufferbedingungen so gewählt, dass beide Enzyme optimal schneiden konnten oder aber der Verdau wurde nacheinander bei verschiedenen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt.

4.9.2 Dephosphorylierung

Zur Verhinderung einer inter- oder intramolekularen Ligation von restriktionsverdauter Vektor-DNA erfolgte die Zugabe von Alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase) der Firma NEB. Die freien 5'-Phosphatgruppen wurden während einer mindestens einstündigen und maximal zwölfstündigen Inkubation bei 37 °C entfernt.

4.9.3 Ligation

Die Verknüpfung von durch Restriktionsendonukleasen und Phosphatasen modifizierten DNA-Fragmenten erfolgte durch die T4-DNA-Ligase der Firma NEB unter Zugabe des mitgelieferten Puffers für 4 bis 12 Stunden bei 16 °C oder Raumtemperatur. Das Ansatzvolumen betrug 20-40 µl und enthielt 400 bis 1200 Units Enzym. Eine Unit ist definiert als die Menge an Enzym, die 50 % der *Hind*III-Fragmente der Lambda-Phagen-DNA in 30 min bei 16 °C ligiert.

4.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA nach Größe erfolgte in horizontalen Gelkammern. Zur Auftrennung wurden Gele in TPE-Puffer (89 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,021 % (v/v) H₃PO₄, pH 7,5) mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen von 1 % bis 2,5 % (w/v) und verschiedenen Taschengrößen von 10 bis 100 µl Fassungsvermögen eingesetzt. Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA wurden 30 ml Agarosegel mit 3 µl GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) versetzt, welches mit der DNA interkalierte. Die DNA wurde mit 6-fachem DNA-Ladepuffer (0,2 % Bromphenolblau, 0,1 M EDTA, 33 % Glycerin) mit einer finalen Konzentration von 1-fach versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V für 50 Minuten durchgeführt. Unter UV-Licht mit 302 nm konnte die Fluoreszenz des GelReds an DNA sichtbar gemacht und fotografiert werden. Zur Größenbestimmung wurde der 2-log DNA-Ladder der Firma NEB genutzt (0,1-10 kb).

4.11 Präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach erfolgreicher elektrophoretischer Auftrennung von enzymatisch modifizierter DNA auf einem Agarosegel wurden die einzelnen Fragmente auf einer UV-beleuchteten Arbeitsfläche (365 nm) aus dem Gel präpariert. Anschließend erfolgte die DNA-Isolierung mit dem AgaroseOut Kit der Firma Roboklon. Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit Puffer Orange-A bei 55 °C geschmolzen, auf eine mit Aktivierungs-Puffer A behandelte Säule gegeben und mit Waschpuffer A1 und A2 entsprechend der Anleitung gewaschen, bevor die DNA mit 40 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert wurde.

4.12 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen erfolgte mittels PCR durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide (Primer), welche komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden DNA-Stücken waren. Die thermostabilen DNA-Polymerasen Phusion (NEB, aufgrund der 3'-5'-Exonukleasefähigkeit zur Klonierung) oder Long-Amp (NEB, zur Analyse) verlängerten die DNA-Stücke an den 3'-Enden der Primer durch Einbau von zugesetzten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs).

Tabelle 7: Verwendete Primer.

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'
1	AtBioYfor	ggcCCATGG gc gccatgacgacccg
2	AtBioYrev	ccgAGATCTggcgcgctgcggcagca
3	RpBioYfor	cggCCATGG Gcg ctcggttcgtcc
4	RpBioYrev	gcgAGATCTgcggtggcggtcgacgatg
5	BioY-Bjfor	GCGccatggcgccaacccggccgggtg
6	BioY-Bjrev	CAGagatctcccgcggcgatcgac
7	BioY-Smfor	GGGccatggctaccagagatctcgtcc
8	BioY-Smrev	GCGggatccgacgcgcgcggcag
9	BioY-Plfor	CGCccatgggtaccaaagatattgtttatatagcac
10	BioY-Plrev	CGGagatctagaacgcggttcaagagtgg
11	BioY1-Obfor	GCGccatggctctggaaccactcaaagcc
12	BioY1-Obrev	CAGggatcccacagcgcggcgattatgg
13	BioY2-Obfor	CACccatggcccaggcatcgacggcacgcgtcctgacc
14	BioY2-Obrev	GCGagatctgccgcggcgcgggccg
15	BioY-Rdfor	GCAccatgggcccttgccgcggcgcg
16	BioY-Rdrev	CGGagatctgcgcgcgcgatcgccgacc
17	BioY1-Spfor	CCGacatgtgcatgactgttctggccg
18	BioY1-Sprev	CGCagatctgccgcggcggttgcccacc
19	BioY2-Spfor	CCGccatggcacagaccaccgaagc
20	BioY2-Sprev	CCGagatctgccatgacgggcgcc
21	LlacBioY1_NcoIfor	CGAccatggCTAACAATCAGAAAGTC
22	LlacBioY1_BglIIrev	CGCagatctCTTTCTAAAATAAAGTTC
23	LlacBioY2_NcoIfor	CGAccatggAAAAACAAAAATTATATTC
24	LlacBioY2_BglIIrev	CGCagatctGTTTGTAAGTATTTATTTGTG
25	PciI-PimA-for	GCGacatgtCCCATCCCGGTGAGCAG
26	BglII-PimA-rev	CGCagatctCTTGGTCTGTGTCTTGG
27	RcBioY-BglIIfor	gcgAGATCTatggaacgtaacgtaaccctg
28	RcBioY_D164N	cccgggcAaCctggtcaaggtggtggtg
29	RcBioY_K167R	gggcgatctggtcCGTgtggtggtgacgg
30	RcBioY_K167Q	gggcgatctggtcCAGgtggtggtgacg
31	RcBioY-SfiI-for	ggcgggcggccgcggcgcccttg
32	RcBioY-NcoIrev	cggccatggcGCCGCGGGCGAGCAGCGCCGAG
33	BioY-SfiI-rev	ccaaggccgcgcggccgcccgc
34	pIIKS-XbaIfor	ggccgattcattaatgcagctggcTCTAGaggtttcccg

Fortsetzung Tabelle 7: Verwendete Primer.

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'
35	BioY-PvuIIrev	gcctcttcgctattacgccagctgctctagacTCAagatctgccc
36	RcBioN-NcoIfor	GCGCCATGGTGAGCCTCGCGCTGCCCTGTCTG
37	RcBioN-BglIIrev	GCGAGATCTCGTTCCAACGGTGTCTCTCCCTTTGC
38	NikM_A48Wfor	GGTTGCGCTGGTCGCGtgGTTTCAGCTTCGTGATC
39	NikM_A48Wrev	GATCACGAAGCTGAACcaCGCGACCAGCGCAACC
40	NikM_T65Afor	CGATTCCGGGCGGCACGgCGGCCCATGCGGCG
41	NikM_T65Arev	CGCCGCATGGGCGGcCGTGCCGCCCGGAATCG
42	NikM_H67Afor	GGCGGCACGACGGCCgcTGCGGCGGGGATCGG
43	NikM_H67Arev	CCGATCCCCGCGCGAgcGGCCGTCGTGCCGCC
44	NikM_G70Afor	CGGCCCATGCGGCGGcGATCGGCATCGCGG
45	NikM_G70Arev	CCGCGATGCCGATCgCCGCCGCATGGGCGG
46	NikM_G79Afor	GCGGTGCTTCTCGcCCCCCTGGGCGGGCG
47	NikM_G79Arev	CGCCGCCCAGGGGgCGAGAAGCACCGC
48	NikM_H194Afor	CGCCATGGCGCTGACCgcTCTGACGATCGCCG
49	NikM_E202Nfor	CGCCGGCGCGGCCAacTTCATCGTCACCG
50	NikM_E202Nrev	CGGTGACGATGAAgttGGCCGCGCCGGCG
51	NikM_E202Qfor	CGCCGGCGCGGCCcAGTTCATCGTCACCG
52	NikM_E202Qrev	CGGTGACGATGAACtgGGCCGCGCCGGCG
53	NikM_E202Dfor	CGCCGGCGCGGCCGatTTCATCGTCACCG
54	NikM_E202Drev	CGGTGACGATGAAaTCGGCCGCGCCGGCG
55	NikM_E202Afor	CGCCGGCGCGGCCGcGTTTCATCGTCACCG
56	NikM_E202Arev	CGGTGACGATGAACgCGGCCGCGCCGGCG
57	NikM_T206Vfor	CCGAGTTCATCGTCgttGCCGGGCTTGTCG
58	NikM_T206Vrev	CGACAAGCCCGGCCaacGACGATGAACTCGG
59	NikM_T206Afor	CCGAGTTCATCGTCgCCGCCGGGCTTGTCG
60	NikM_T206Arev	CGACAAGCCCGGCCGcGACGATGAACTCGG
61	NikM_G79Prev	CACCGCCGCCCAGGGcgGAGAAGCACCGCCG
62	NikM_Q94Erev	AGAAGATCGCCTcGATCAGCAGCGCCAC
63	NikM_D100Nrev	GTGATGCCGCCATtGCCAAAGAAGATCGC
64	NikM_H194Efor	CGCCATGGCGCTGACCgAaCTGACGATCGCCG
65	NikM_H194Qfor	CGCCATGGCGCTGACCcAgCTGACGATCGCCG
66	NikM-Nsi+	ccATGCATATTCCCGACGGCTATCTGAGC
67	NikN_BglII-	cgcagatctGCCCCGCGCGCCGGGTCACTGC
68	M13for	acgacgttgtaaaacgacggccag
69	M13rev	ttcacacaggaaacagctatgac
70	XFPfor	gcgagatctgccatggtgagcaagggcgag
71	XFPprev	Gcgccatggcagatcctcttgtagcgtccatg
72	RcBioY_163Seq	gtgcttctggtgcaggcgctg
73	pIIKS_Seqrev	gggaagggcgatcgggtgcggg
74	pIIKS_Seqfor	gcggaagagcgccaatacgc
75	BioYEndSeq	cggcgctgctcggcgcggcagat
76 (PH4)	RcBioY-BglIIrev	GCGCAGATCTGCCGCGGGCGAGCAGCGCCGAG
77 (PH8)	RcBioY-NcoIfor	GCGCCATGGAACGTAACGTAACCCCTGATCG

Die Primer #76 und #77 stammen aus der Vorgängerarbeit von Peter Hebbeln (Hebbeln 2008). Weitere, jedoch nicht für die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse relevante Primer sind im Anhang in Tabelle 12 zu finden.

Die Bedingungen für die PCR wurden entsprechend den eingesetzten Primern und der Länge des zu amplifizierenden Stückes variiert und folgten dem in Tabelle 8 genannten Programm.

Tabelle 8: PCR-Programm

PCR-Zyklus	Temperatur in °C	Zeit in sec
Primäre Denaturierung	95-98	30-300
PCR Reaktion 20-30 x A: Denaturierung B: Primer-Annealing C: Verlängerung	95-98 Primer-abhängig Polymerase-abhängig 72 (Phusion) 65 (Long-Amp)	10-20 30 Fragmentlängen-abhängig 20/1 kb (Phusion) 45/1 kb (Long-Amp)
Finale Verlängerung	Polymerase-abhängig 72 (Phusion) 65 (Long-Amp)	600

In Tabelle 9 sind die für die PCR-Reaktion nötigen Komponenten aufgeführt.

Tabelle 9: PCR-Komponenten für Phusion und Long-Amp Polymerase

PCR-Ansatz für Phusion Polymerase	PCR-Ansatz für Long-Amp Polymerase
GC Puffer [1 x]	Long-Amp Puffer [1 x]
dNTPs [200 µM]	dNTPs [200 µM]
Primer for/rev [2,5 µM]	Primer for/rev [1 µM]
DMSO [3 %]	
Phusion Polymerase [2U auf 100 µl Ansatz]	2,5 U/µl Long-Amp Polymerase [1,25 U auf 20 µl Ansatz]
10-100 ng DNA	2 µl DNA-Lösung (Zellmaterial mittels Zahnstocher in 20 µl H ₂ O 10 min, 95 °C erhitzt)

4.13 Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR

In Tabelle 7 sind die Primer für eine ortsspezifische Mutagenese enthalten. Die Oligonukleotid-Primer enthielten die modifizierte Base, die 5'- und 3'-seitig von je 15 bp der Wildtyp-DNA-Sequenz flankiert war. Die erste PCR-Reaktion wurde mit dem Mutagenese-Primer und einem zweiten Primer auf dem Plasmid oder innerhalb des Gens durchgeführt. Das circa 200 bp lange resultierende DNA-Fragment wurde in einer zweiten PCR als Primer genutzt, um die DNA-Sequenz inklusive beidseitig flankierender Restriktionsschnittstellen zu vervielfältigen.

Die Überprüfung von DNA-Sequenzen nach erfolgreicher Mutagenese und Klonierung in *E. coli* erfolgte durch den Sequenzierservice der Firma SMB unter Verwendung von isolierter Plasmid-DNA mit einem genspezifischen Primer oder dem M13for- oder M13rev-Primer nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* 1977.

4.14 Reinigung von PCR-Produkten

Um mittels PCR amplifizierte DNA weiter verwenden zu können, mussten Primer, dNTPs und Pufferbestandteile entfernt werden. Dazu wurde das PCR-Produkt entweder wie in 4.11 beschrieben aus dem Agarosegel präpariert oder mittels des PCR-Clean-up-DNA-Kits (Roboklon) isoliert. Das PCR-Produkt wurde mit Orange-Puffer-DX gemischt, auf eine mit Aktivierungs-Puffer behandelte Säule gegeben und mit Waschpuffer DX1 und DX2 gewaschen. Die DNA wurde mit 40-50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

4.15 Übertragung von Plasmid-DNA in *E. coli*

E. coli-Zellen wurden aus einer Übernachtskultur in 20 ml Medium ohne Antibiotikum angeimpft und nach 2 bis 3 Stunden pelletiert (10 min, 5000 rpm). Das Pellet wurde in 5 ml gepuffertem CaCl₂ (10 mM Tris, 50 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂, pH 7,5) resuspendiert und 30 min bis 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 Minuten wurde das Zellpellet mit 1,7 ml gepuffertem CaCl₂ und 300 µl 85 %-igem Glycerin resuspendiert. Ein 200 µl Aliquot der chemisch kompetenten Zellen wurde mit Plasmid-DNA versetzt und eine Minute bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C eine Stunde bei 300 rpm schüttelnd inkubiert, bevor sie auf LB-Agaroseplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgespatelt wurden.

4.16 Isolierung von Proteinen

Puffer für die Isolierung (4.16) und Reinigung (4.17) von Proteinen im Überblick.

35 mM Na/K-Phosphatpuffer:

25 mM Na₂HPO₄

11 mM KH₂PO₄, pH 7,0

Grundpuffer I:

50 mM Tris

300 mM NaCl

5 % Glycerin, pH 7,5

Solubilisierungspuffer:

50 mM Tris
300 mM NaCl
5 % Glycerin
20 mM Imidazol, pH 8,0

Grundpuffer II:

50 mM Tris
300 mM NaCl
5 % Glycerin
500 mM Imidazol, pH 7,5

Grundpuffer I und II wurden zur Herstellung von Waschpuffer II sowie des Elutionspuffers genutzt.

4.16.1 Isolierung von Gesamtprotein aus *E. coli*-Zellen

1,5 ml Bakterienzellen wurden mit 1 mM IPTG versetzt und nach vier Stunden Inkubation oder aus einer Übernachtskultur geerntet. Die optische Dichte der Kultur wurde bei OD₅₇₈ bestimmt und die Zellen wurden zweimal mit 35 mM Na/K-Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Na/K-Phosphatpuffer resuspendiert und mit 6-fachem SDS-Probenpuffer (350 mM Tris pH 6,8; 10,28 % SDS; 36 % Glycerin; 0,012 % Bromphenolblau; 5 % β -Mercaptoethanol frisch zugesetzt) sowie 30 μ l Proteinase-Inhibitor-Cocktail-Mix (PIC, complete, EDTA-frei, Roche) in 35 mM Na/K-Phosphatpuffer versetzt, so dass rechnerisch eine End-OD von circa 6 bis 9 erreicht wurde. Bei Bedarf wurden die Proben unmittelbar vor der SDS-PAGE drei Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 15000 rpm fünf Minuten abzentrifugiert.

4.16.2 Isolierung von Membranproteinen aus *E. coli*-Zellen

Mit IPTG induzierte Bakterienkulturen aus 500 ml bis 2 l Kulturvolumina wurden nach 7 h oder 24 h Wachstum bei 37 °C in einer Sorvall RC6+ Zentrifuge (Rotor FIBER Lite F9-4x1000y, Sorvall) bei 6000 rpm, 12 Minuten, 4 °C geerntet und mit 35 mM Na/K-Phosphatpuffer gewaschen. Das Pellet wurde entweder bei -20 °C aufbewahrt oder sofort mit 10 bis 50 ml 35 mM Na/K-Phosphatpuffer mit PIC-Mix (complete, EDTA-frei, Roche) und DNase I resuspendiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Die resuspendierten Zellen wurden durch zweimalige Passage mittels FrenchPress (HTU DIGI F-Press, G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik) bei 18000 Psi (circa 1,2 kbar) oder Basic-Z pressure cell (Constant Systems Ltd.) bei 1,7 kbar aufgeschlossen. Größere Zelltrümmer und unzerstörte Zellen wurden durch Zentrifugation (Megafuge 2.0, Heraeus Instruments) bei 5000 rpm für 10 Minuten abgetrennt und anschließend wurde die Probe mittels Ultrazentrifugation (36000 rpm, 45 min; Sorvall Ultra Pro 80) in cytoplasmatische

(Überstand) und membrangebundene Bestandteile (Pellet) getrennt. Das Membranpellet wurde mit Solubilisierungspuffer versetzt und mit einem Glashomogenisator „Potter“ in kleinere Membranstücke zerteilt. Während einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Membranproteine von den Membranlipiden getrennt, indem das zugegebene n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM, 2 % (w/v)) Detergenzmizellen bildete, welche die Proteine enthielten und so die Stabilität und native Faltung der Membranproteine weiterhin gewährleisteten. Zur Abtrennung der Membranlipide von den solubilisierten Membranproteinen erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation (36000 rpm, 45 min). Der Überstand mit den sich nun in Lösung befindlichen Protein-Detergenzmizellen wurde für eine Affinitätschromatografische Auftrennung der Proteine genutzt.

4.17 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie

4.17.1 Affinitätschromatografie mittels Ni^{2+} -NTA-Agarose (Qiagen)

Die Reinigung von 10-fach His-tag-fusionierten Proteinen basierte auf der Wechselwirkung der Histidinreste mit immobilisierten Ni^{2+} -Ionen. Untereinander verknüpfte Agarosebeads sind hierbei mit dem Liganden Nitrilotriessigsäure (NTA) versehen, welcher vier der sechs Koordinierungsstellen der Ni^{2+} -Ionen besetzt, wodurch nur die restlichen zwei für die reversible Bindung der 10-fach His-getaggtten Proteine frei sind. Die Ni-NTA-Agarose wurde mit einem Bettvolumen von 0,5-1 ml in 2,5-6 ml Säulen gegeben und mit Solubilisierungspuffer gespült, um den für die Proteinbindung optimalen pH von 8,0 zu gewährleisten. Anschließend wurde der Proteinextrakt mit der Ni^{2+} -NTA-Matrix vermischt und über Nacht bei 4 °C unter konstantem Schwenken inkubiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Matrix wurde mit 25-50 ml Solubilisierungspuffer mit 0,05 % (w/v) DDM und anschließend mit 50-100 ml Waschpuffer II (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin, 100 mM Imidazol, 0,05 % (w/v) DDM, pH 7,5) von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt. Die Elution der Proteine erfolgte durch die Verdrängung des 10-fach His-tags von den Ni^{2+} -Ionen durch hohe Imidazol-Konzentrationen (300-500 mM) weiterhin in Anwesenheit von 0,05 % (w/v) DDM. Eluiert wurde in 200-500 μl Fraktionen mit 5- bis 10-minütigen Pausen mit Elutionspuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin, 300 mM Imidazol, 0,05 % (w/v) DDM, pH 7,5). Nach Vereinigung der Proben erfolgte die Entsalzung über PD-10 Entsalzungssäulchen (GE Healthcare, siehe 4.18). Die Säulenmatrix wurde durch mehrmaliges Waschen mit 500 mM imidazolhaltigem Grundpuffer II und anschließend imidazolfreiem Grundpuffer I regeneriert.

4.17.2 Affinitätschromatografie mittels Anti-FLAG-M2-Agarose (Sigma A2220)

Durch die Anti-FLAG-M2-Agarose-Matrix ist eine Reinigung von FLAG-getaggten Proteinen möglich. Der M2-Antikörper bindet hierbei den aus der Aminosäuresequenz DYKDDDDK bestehenden FLAG-tag. Dafür war eine Aktivierung der Matrix mit 3 Säulenvolumen 0,1 M Glycin (pH 3,5 mit HCl) und eine anschließende Equilibrierung mit Grundpuffer I mit 5 Säulenvolumen nötig. Abweichend zur in Kapitel 4.16.2 beschriebenen Isolierung von Membranproteinen wurden die Proteine hier mit Grundpuffer I mit 2 % (w/v) DDM aus der Membran solubilisiert und nach der anschließenden Ultrazentrifugation mit der Anti-FLAG-Matrix über Nacht inkubiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde mit 50-100 ml Grundpuffer I mit 0,05 % (w/v) DDM gewaschen, bevor die Proteine mit 6 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin, 0,05 % (w/v) DDM, pH 3,5) in drei Schritten zu je 2 ml von der Säule eluiert wurden. Um eine Schädigung der nativ eluierten Proteine zu verhindern, wurden 150 µl 1 M Tris, pH 8,0 in dem Auffanggefäß (Amicon® Ultra 15 ml, Millipore) vorgelegt und die Proteine sofort durch Zentrifugation 20 min, 4500 rpm, 4 °C vom Glycin-Puffer getrennt. Nach Zugabe von 2 ml Grundpuffer I mit 0,05 % (w/v) DDM wurde das Volumen erneut durch Zentrifugation verringert. Die Regeneration der Säulenmatrix erfolgte durch dreimaliges Waschen mit 0,1 M Glycin HCl und der pH-Wert wurde durch Waschen mit Grundpuffer I neutralisiert. Die Matrix wurde nie länger als 20 Minuten mit 0,1 M Glycin inkubiert. Die Lagerung der Matrix erfolgte in 50 %-igem Glycerol in Grundpuffer I mit 0,02 % Acid bei -20 °C.

4.17.3 Affinitätschromatografie mittels Strep-Tactin-Agarose

Zur Reinigung von Strep-getaggten Proteinen wurde das aus der ersten Ultrazentrifugation (siehe 4.16.2) resultierende Membranpellet mit Strep-Puffer (100 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 8,0) gepottet und die Proteine in Anwesenheit von 2 % (w/v) DDM aus der Membran solubilisiert. Nach der zweiten Ultrazentrifugation erfolgte die Inkubation der Proteine auf mit Strep-Puffer equilibrierter Strep-Tactin-Matrix über Nacht. Strep-Tactin ist eine verbesserte Variante des Streptavidin und Proteine mit einem fusionierten Strep-tag (WSHPQFEK) binden mit hoher Affinität. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Strep-Puffer mit 0,05 % (w/v) DDM entfernt, bevor die zu reinigenden Proteine mit 6-mal 250 µl Elutionspuffer (Strep-Puffer mit 0,05 % (w/v) DDM und 5 mM Dethiobiotin) von der Matrix eluiert wurden. Das im Puffer enthaltene Dethiobiotin ist ein Analogon zu Biotin, dem natürlichen Streptavidinliganden, und ist somit in der Lage, durch Bindung an Strep-Tactin die Strep-getaggten Proteine effizient zu verdrängen. Die eluierten Proteine konnten sofort weiter

verwendet werden, ohne dass eine Entsalzung wie bei 4.17.1 oder 4.17.2 nötig war. Die Strep-Tactin-Matrix wurde mit Regenerationspuffer (Strep-Puffer mit 2,5 mM Hydroxy-Azophenyl-Benzoessäure (HABA)) von Dethiobiotin befreit und HABA wurde durch mehrmaliges Waschen mit Strep-Puffer entfernt.

4.18 Umpuffern von Proteinlösungen

Zum Entsalzen und Umpuffern von Proteinen wurden PD-10-Entsalzungssäulen mit einem Maximalvolumen von 2,5 ml oder PD MiniTrap G25-Säulchen mit einem Maximalvolumen von 550 µl der Firma GE Healthcare nach Herstellerangaben verwendet. Die Entsalzung erfolgte mit Grundpuffer I mittels Durchfluss durch Schwerkraft.

4.19 Größenausschluss-Chromatografie mittels eines Äkta-Systems

Zur Analyse von Proteinkomplexen nach Affinitätschromatografie sowie zum Auftrennen dieser Komplexe im nativen Zustand wurde eine Gelfiltration über eine Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences) mit 24 ml Bettvolumen durchgeführt. Dazu wurde die Säule mittels eines Äkta-Purifiersystems (Amersham Pharmacia Biotech) zuerst mit destilliertem Wasser und anschließend mit Grundpuffer I mit 0,05 % (w/v) DDM gespült. Alle Puffer und Lösungen wurden zuvor filtriert, um das System vor dem Eindringen von Staubteilchen zu schützen. Bei einer Flussrate von 0,25 ml/min mit Grundpuffer I wurden 500 µl bis 1 ml Proteinprobe auf die Säule gegeben und die Fraktionen in 200 µl-Portionen aufgefangen. Bei 280 nm wurde der Proteinanteil in den verschiedenen Fraktionen detektiert; das Zielprotein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE (4.22) oder Massenspektrometrie (4.21) verwendet. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Amicon® Ultra 0,5 ml oder 15 ml Zentrifugenröhrchen mit Filtern von 10 kDa bis 100 kDa Ausschlussgröße (Millipore) auf ein Volumen von 200 bis 500 µl reduziert.

4.20 Proteinkonzentrationsbestimmung

4.20.1 mittels einer modifizierten Lowry-Methode

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Affinitätschromatografie, Umpufferung der Probe oder Aufkonzentration mittels Amicon® Ultra-Gefäßen wurde das Total Protein Kit

der Firma Sigma nach Lowry *et al.* 1951 und modifiziert durch Peterson 1977 eingesetzt. Da in dieser Arbeit hauptsächlich Membranproteine analysiert wurden, wurde die Variante der Proteinbestimmung mit vorhergehender Proteinfällung durch Trichloressigsäure und Deoxycholat angewandt. Die Proteinbestimmung wurde entsprechend den Herstellerangaben mit 25-100 µl Probe in 1 ml Wasser durchgeführt (40- bis 10-fache Verdünnung). Nach der Fällung der Proteine erfolgte die Zugabe von Lowry-Reagenz. Nach 20-minütiger Inkubation wurde Folin & Coicalteu's Phenol-Reagenz zugefügt und nach weiteren 30 Minuten die Absorption bei 750 nm gemessen. Als Kontrolle und zur Bestimmung der Eichgerade diente ein Rinderserumalbumin (BSA)-Standard mit folgenden Proteinkonzentrationen: 0, 5, 10, 15, 25, 50, 100 µg/ml.

4.20.2 mittels der Bradford-Methode (Bradford 1976)

Sollte der Proteingehalt nur grob geschätzt oder Fraktionen während der Umpufferung oder Elution auf ihren Proteingehalt (Ja/Nein bzw. Wenig/Viel) getestet werden, wurde diese Methode verwendet. 200 µl einer Bradford-Lösung (0,007 % Servablue G250; 5 % Ethanol; 8,5 % Phosphorsäure; dunkel gelagert; 24 h nach Herstellung filtriert) wurden mit 5 µl Proteinprobe vermischt. Eine für das Auge sichtbare Blaufärbung diente als Indikator für den Proteingehalt.

4.20.3 mittels der BCA-Methode

Ähnlich wie die Proteinbestimmung mittels Lowry-Reagenz basierte diese Methode auf der Biuret-Reaktion in Kombination mit der Ausbildung eines Kupfer-Bicinchonin-Säure-Komplexes. Der Farbumschlag zu blauviolett konnte bei 562 nm gemessen werden. Die Lösungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) verwendet. Als Kontrolle und zur Bestimmung einer Eichgerade diente BSA in entsprechenden Konzentrationen.

4.21 Massenspektrometrie

Zur Quantifizierung von Biotin in Proteinproben mittels Massenspektrometrie wurde das gereinigte Protein in Grundpuffer I (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 % Glycerol, 0,05 % DDM, pH 7,5) in einer Konzentration von 10 µM eingestellt. Nach einer Denaturierung des Proteins bei 95 °C für fünf Minuten erfolgte die Pelletierung des Proteins bei 15000 rpm für 10 min

und 200 µl Überstand mit Biotin wurden abgenommen. In einem Agilent 1200 „high-performance“-Flüssigkeitschromatografen mit einer Zorbax 300SB C18-Säule (300 Å Porengröße; 2,1 mm ID x 150 mm; 5 µm Partikelgröße) wurden 50 µl der Probe analysiert. Die Probe wurde isokratisch über einen Zeitraum von 10 Minuten mit einer Flussrate von 0,1 ml/min eluiert. Als Trägermedium diente 25 % Acetonitril mit 0,1 % Formiat in Wasser. Die Elution von Biotin erfolgte zwischen 5 und 6,5 Minuten. Nach der „high-performance“-Flüssigkeitschromatografie wurde die Probe in ein Agilent MDS „electrospray ionization time-of-flight“ (ESI-TOF) Flugzeit-Massenspektrometer mit dem Trägergas Stickstoff bei einer Flussrate von 12 l/min und 350 °C übertragen. Die Fragmentorspannung betrug 150 V, die „cone“-Spannung 250 V und die Kapillarspannung 3000 V. Die Spektraldaten wurden bei einem Masse-zu-Ladung-Bereich von 205 bis 400 gemessen und Biotin wurde als Natriumaddukt (Biotin-Na bei 267,0774) und als Protonenaddukt (Biotin-H bei 245,0945) im „total-ion“-Chromatogramm gefunden. Mittels der Agilent MASSHUNTER-Software wurde das Chromatogramm extrahiert, integriert und der Biotingehalt über die Peakfläche ermittelt. Dabei wurde als Vergleich die Peakfläche von gleich behandelten, frischen Biotinproben bekannter Konzentration zugrunde gelegt. Die Quantifizierung von Biotin kann in einem Größenbereich von 200 pmol bis 1 nmol erfolgen, wie Abbildung 47 zu entnehmen ist. Ausgehend von einer 0,1 mM Biotinstammlösung wurden die unterschiedlichen Verdünnungen im gleichen Grundpuffer I hergestellt, in dem die zu messenden Proteinproben auf 10 µM Proteinkonzentration eingestellt wurden.

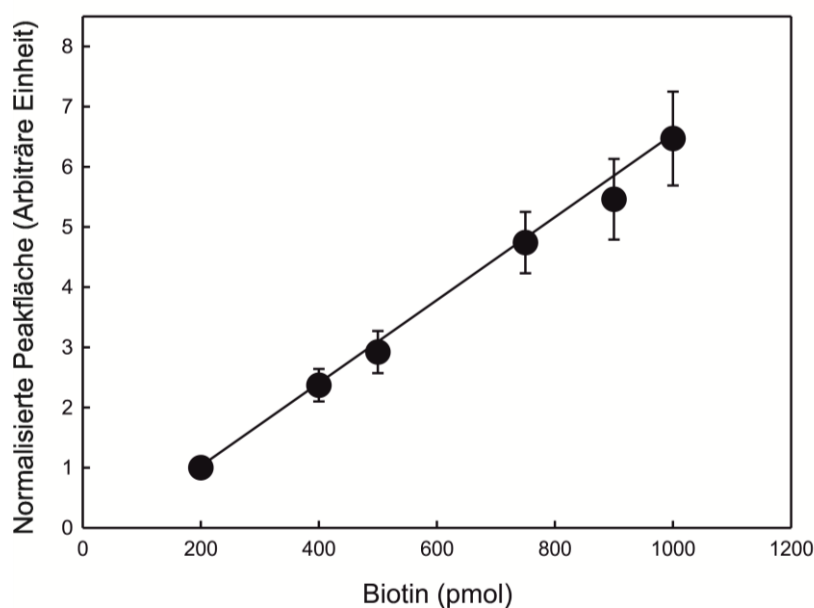


Abbildung 47: Quantifizierung von Biotin durch HPLC-gekoppelte ESI-TOF-Massenspektrometrie. Frisch verdünnte Biotinproben mit definierter Konzentration wurden analog zu den zu untersuchenden Proteinproben behandelt und die Peakfläche nach Analyse mittels HPLC-gekoppelter ESI-TOF-Massenspektrometrie berechnet. Die Daten der Eichgerade wurden aus acht verschiedenen Messungen gewonnen.

4.22 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient dem Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe. Durch Denaturieren und Anlagerung von negativ geladenem SDS wandern die linearisierten Proteine einzeln durch die Polyacrylamidmatrix in Richtung Pluspol des angelegten Spannungsfeldes. Dabei wandern kleinere Proteine schneller durch die Matrix als größere. Die Elektrophorese wurde in Vertikalkammern durchgeführt. Auf einem Gel (10 x 8 x 0,1 cm) konnten 13 Proben analysiert werden. Für die bessere Auftrennung der Proteine wurde ein Trenngel mit 13 %-iger Acrylamidkonzentration mit einem Sammelgel mit 4 %-iger Acrylamidkonzentration überschichtet. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Zusammensetzung für ein SDS-Polyacrylamidgel

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Bis-Acrylamid (30 %)	13 %	4 %
Sammelgelpuffer (1 M)	-	125 mM
Trenngelpuffer (1,5 M)	375 mM	-
bidestilliertes H ₂ O	Auf Endvolumen	Auf Endvolumen
SDS (10 %)	0,1 %	0,1 %
Ammoniumpersulfat APS (10 %)	0,1 %	0,1 %
TEMED (0,1 %)	0,01 %	0,01 %

Für ein Gel waren circa 5 ml Trenngel und 2 ml Sammelgel nötig. Der Lauf erfolgte experimentabhängig bei konstanten 120 V und circa 30 mA pro Gel oder 80 V beim Probeneinlauf in das Sammelgel und 120 V während der Proteintrennphase. Nach 75 Minuten konnten die Proteine auf dem SDS-Gel mittels Coomassie-Färbelösung spezifisch angefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden (4.24).

6-fach SDS-Probenpuffer

350 mM Tris pH 6,8

10,28 % SDS

36 % Glycerin

0,012 % Bromphenolblau

5 % β -Mercaptoethanol frisch zugesetzt

Coomassie-Färbelösung:

42,5 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

5 % (v/v) Methanol

0,2 % (w/v) Coomassie BrilliantBlue R250

0,05 % (w/v) Coomassie BrilliantBlue G250

Entfärbelösung:

0,7 % (v/v) Essigsäure

25 % (v/v) Methanol

SDS-Laufpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

4.23 Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die bessere Auftrennung kleinerer Proteine zwischen 1 und 100 kDa und besonders für solche unter 30 kDa ist das Verfahren der Tricin-SDS-PAGE besser geeignet (Schagger & von Jagow 1987) als eine normale SDS-PAGE. Die Methode wurde nach Schagger (2006) optimiert und unterscheidet sich von dem Verfahren der SDS-PAGE (4.22) nur im Laufpuffer und in der Gelzusammensetzung, nicht jedoch im Probenauftrag oder in der angelegten Spannung.

Tricin-Gel-Puffer 3-fach:

3 M Tris

0,3 % (w/v) SDS

37 % (v/v) HCl

pH 8,45

Kathode-Puffer 10-fach:

1 M Tris

1 M Tricin

1 % (w/v) SDS

pH 8,25

Anode-Puffer 10-fach:

1 M Tris

0,225 M HCl

pH 8,9

Ein 16 %-iges Tricingel setzt sich zusammen aus 16 % Bis-Acrylamid, 1-fach Tricin-Gel-Puffer, 10 g/mol Glycerin, 1 % APS, 0,1 % TEMED.

4.24 Western-Blot und Immunodetektion von getaggten ProteinenTBS-Puffer:

100 mM Tris

150 mM NaCl

pH 7,5

TBS-T-Puffer:

Zugabe von 0,05 % (v/v) Tween 20 zu
TBS-Puffer.

Zum Nachweis der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dabei wurde das Verfahren des Semi-Dry-Blots angewendet. SDS-Gel, Nitrocellulosemembran und vier Lagen Whatman-Papier wurden mit Transferpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin) equilibriert und anschließend ausgehend von der Anodenplatte des Blotgeräts (BIO-RAD Trans-Blot® SD, Semi-Dry Transfer Cell) in folgender Reihenfolge übereinander geschichtet: Zwei Lagen Whatman-Papier, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel, zwei Lagen Whatman-Papier, Kathodenplatte. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 20 V für 25 Minuten.

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran mit Magermilchpulver (5 % Magermilchpulver in TBS-T) für eine Stunde unter Schütteln oder über Nacht bei 4 °C blockiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte, 2x TBS-T für fünf Minuten und 1x TBS für fünf Minuten, bevor die Membran eine Stunde mit dem Antikörper-Alkalische-Phosphatase (AP)-Konjugat (siehe Tabelle 11) unter Schütteln inkubiert wurde.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Puffer
α -His-Konjugat: monoklonales Anti-Polyhistidin-AP-Konjugat (Sigma A5588)	1:2000	TBS + 1 % BSA
α -Strep-Konjugat: Strep-Tactin-AP-Konjugat (IBA)	1:20000	TBS-T
α -FLAG-Konjugat: monoklonales Anti-FLAG-M2-AP-Konjugat (Sigma A9469)	1:1000	TBS-T
α -cMYC-Konjugat: monoklonales Anti-cMYC-AP-Konjugat (Sigma A5963)	1:1000	TBS + 1 % BSA

Reste des Antikörpers wurden durch erneutes dreimaliges Waschen mit TBS-T und TBS entfernt und die Detektion der Alkalischen Phosphatase erfolgte über die Farbreagenzien 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT). Dabei wurde die Nitrocellulosemembran mit Entwicklungspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 9,5) mit 1:1000 BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF) und 1:1000 NBT (100 mg/ml in 70 % DMF) inkubiert. Die Alkalische Phosphatase spaltet das Phosphat von BCIP ab, wodurch ein Indoxyl-Derivat entsteht, welches durch Luftsauerstoff zu einem Indigofarbstoff oxidiert wird. Durch die gleichzeitige Reduktion des NBT zu einem blauen Di-Formazanfarbstoff ist die Detektion der Alkalischen Phosphatase noch sensitiver. Antikörper-Bindung an ein Protein führte daher zu einer blauvioletten Bande. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Membran mit Wasser gespült und dokumentiert.

4.25 Messung der zellassozierten Radioaktivität in lebenden Zellen

4.25.1 Messung der [^3H]Biotinakkumulation durch rekombinante *E. coli*-Zellen

Für die Messungen wurden sowohl rekombinante *E. coli* XL1-Blue- als auch S1039-Stämme über Nacht in LB-Medium mit Antibiotikum und 1 mM IPTG bei 37 °C in einem Kulturvolumen von 5-20 ml angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 5000 rpm für 10 Minuten pelletiert und zweimal mit 35 mM Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen, bevor eine OD₅₇₈ von 0,4 in 35 mM Na/K-Phosphatpuffer eingestellt wurde. Die Zellen wurden 1:1 mit 8 nM radioaktiver [^3H]Biotinlösung versetzt. Dadurch wurde eine Endzelldichte von 0,2 und eine [^3H]Biotinkonzentration von 4 nM erreicht. Die Zellen wurden bei 37 °C für 3,5 h in einem Wasserbadschüttler inkubiert. Anschließend wurden 500 µl der Zellsuspension durch einen Zellulosenitrat-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm mittels einer Vakuum-Absaugvorrichtung filtriert, mit 5 ml 35 mM Na/K-Phosphatpuffer gewaschen und der Filter in 3 ml Szintillationscocktail (Aquasafe 300 Plus, Zinsser Analytic) überführt. Der [^3H]Biotingehalt (in pmol) der filtergebundenen Zellen wurde mittels eines Packard TriCarb 2900 TR-Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen und auf den Proteingehalt der Zellen (in mg) bezogen. Aus einer Vorgängerarbeit (Hebbeln 2008) ist bekannt, dass 1 ml einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1 260 µg Gesamtprotein enthalten. Für die Bestimmung der auf dem Filter enthaltenen Proteinmenge wurde daher die Endzelldichte in 1 ml nach 3,5-stündiger Inkubation gemessen.

4.25.2 Messung der $^{63}\text{Ni}^{2+}$ - und $^{57}\text{Co}^{2+}$ -Akkumulation durch rekombinante *E. coli*-Zellen

$^{63}\text{NiCl}_2$ -Lösung

19,05 µM $^{63}\text{NiCl}_2$ /ml, 37 MBq

Arbeitslösung: 250 µM, ca. 100 Ci/mol, 25 Ci/ml, spezifische Aktivität ca. 0,0048 pmol

$^{63}\text{NiCl}_2$ /dpm

Die Arbeitslösung setzte sich aus 249 µl einer kalten 250 µM NiCl_2 -Lösung und 1 µl der heißen 19,05 µM $^{63}\text{NiCl}_2$ -Lösung zusammen und entsprach somit 250 µM. Die Aktivität der Messlösung wurde an jedem Messtag neu bestimmt.

$^{57}\text{CoCl}_2$ -Lösung

98,4 μM $^{57}\text{CoCl}_2/\text{ml}$, 37 MBq, $t_{1/2} = 272$ Tage

Arbeitslösung: 250 μM , ca. 43 Ci/mol, 10 Ci/ml, spezifische Aktivität ca. 0,0104 pmol

$^{57}\text{CoCl}_2/\text{dpm}$

Aufgrund der geringen Halbwertszeit wurde die Aktivität der Messlösung (Zusammensetzung äquivalent zur $^{63}\text{NiCl}_2$ -Arbeitslösung) vor jeder Messung neu bestimmt.

Für die Messungen wurden rekombinante *E. coli* XL1-Blue-Zellen über Nacht in LB-Medium mit Antibiotikum bei 37 °C inkubiert. 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aber mit 1 mM IPTG wurden mit 50 μl Zellsuspension der Übernachtskultur beimpft, mit 500 nM $^{63}\text{NiCl}_2$ oder $^{57}\text{CoCl}_2$ versetzt und für weitere 7 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus 1,5 ml der Zellsuspension durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 5000 rpm geerntet, das Pellet wurde zweimal mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und die Zellen wurden in 150 μl des Puffers resuspendiert (10-fach konzentrierte Suspension). Für die Messung des zellulären radioaktiven Metallgehalts wurden 100 μl mit 3 ml Szintillationscocktail (AquaSafe 300, Zinsser) vermischt und mit einem $^{63}\text{Ni}^{2+}$ - oder $^{57}\text{Co}^{2+}$ -spezifischen Zählprogramm im Packard TriCarb 2900 TR-Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen. Um den Gehalt der radioaktiven Metalle in der Zelle auf die Proteinmenge zu beziehen (analog zu 4.25.1), wurden 15 μl der 10-fach konzentrierten Suspension mit 1485 μl 50 mM Tris/HCl-Puffer versetzt und die OD₅₇₈ bestimmt. Metallakkumulation wurde in pmol/mg Protein angegeben.

4.26 Messung der Ureaseaktivität rekombinanter *E. coli*-Zellen nach Wolfram *et al.* 1995

Lösung A:

1 % Phenol in Wasserbad geschmolzen

0,0051 % Nitroprussid-Natrium

Lösung B:

0,5 % NaOH

0,84 % Natriumhypochlorid (v/v)

Lösung A und B frisch angesetzt, bei 4 °C im Dunklen maximal 2 Monate haltbar.

Rekombinante *E. coli*-Zellen, welche zusätzlich das für drei Urease-Untereinheiten (UreA,B,C) und vier akzessorische Proteine (UreD,E,F,G) codierende Plasmid pKAU17 enthielten, wurden über Nacht in 20 ml LB-Medium mit Antibiotikum bei 37 °C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde am frühen Morgen eine Hauptkultur mit einer OD₅₇₈ von 0,05 in

10 ml LB-Medium mit 1 mM IPTG und 0 nM oder 500 nM NiCl_2 beimpft und 6,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen mit einer finalen OD_{578} von 3-3,5 wurden bei 4 °C pelletiert (5000 rpm, 10 min) und zweimal mit 35 mM Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen. Die OD_{578} wurde auf circa 9 eingestellt und genau für die Bestimmung der Proteinmenge (siehe 4.25.1) protokolliert. Die von den Zellen produzierte Urease ist nur dann funktionsfähig, wenn Nickel von den Zellen aufgenommen und in das Enzym integriert wurde. Zur Bestimmung der Ureaseaktivität wurde die Freisetzungsrates von Ammoniumionen aus Harnstoff über die Bildung von Indophenol mittels Phenol und Natriumhypochlorid quantifiziert (Weatherburn 1967). Dazu wurden in 2 ml Endvolumen 25 µl bis 200 µl der Zellsuspension mit 35 mM Na/K-Phosphatpuffer und 0,15 mM Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) gemischt und die Harnstoffspaltungsreaktion durch Zugabe von 5 mM Harnstoff bei 37 °C gestartet. Nach 5, 10, 20 und 30 Minuten wurden 200 µl der Reaktionslösung mit 1 ml Lösung A versetzt und unmittelbar darauf mit 1 ml Lösung B vermischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation erfolgte die photometrische Absorptionsbestimmung des Indophenols bei 546 nm, wodurch die freigesetzten Ammoniumionen quantifiziert werden konnten. Dabei ist eine Unit der Ureaseaktivität definiert als die Menge an Enzym, welche bei 37 °C für die Freisetzung von 2 µmol Ammoniumionen pro Minute nötig ist. Weiterhin muss beachtet werden, dass aus einem Harnstoff-Molekül zwei Ammoniumionen freigesetzt werden. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Ammoniumsulfat-Eichreihe von 0 bis 250 nmol Ammoniumionen.

4.27 Spektrometrische und mikroskopische Messung der Fluoreszenz-Anisotropie in lebenden Zellen

Sowohl Hetero-Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) als auch Homo-FRET sind abstandsabhängige Phänomene und können zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden. Das angeregte Donorfluorophor überträgt bei Abständen <10 nm die Energie auf ein Akzeptorfluorophor, dessen Fluoreszenzemission nachgewiesen wird. Bei Homo-FRET findet der Energietransfer im Gegensatz zu Hetero-FRET nicht zwischen verschiedenen, sondern zwischen gleichen Fluorophoren statt. Bei Homo-FRET verändert sich daher weder die Fluoreszenzintensität noch die -lebenszeit und so können Homo-FRET-Ereignisse nicht direkt bestimmt werden, sondern nur durch die Änderung der Polarisierung des emittierten Fluoreszenzsignals (Bader *et al.* 2011). In Abbildung 48 ist die Methode am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten, an *RcBioY* fusionierten Fluorophors mYFP dargestellt. Durch polarisiertes Anregungslicht werden bevorzugt Fluorophore angeregt, deren Anregungsdipolmoment parallel zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts ausgerichtet ist. Die

Polarisationsrichtung der Emissionsfluoreszenz ist meist gedreht dazu und um dies zu erfassen, wird die Fluoreszenzintensität senkrecht (I_{vh}) und parallel (I_{vv}) zur Anregung gemessen. Daraus berechnet sich nach folgender Formel die Anisotropie (r):

$$r = \frac{I_{vv} - g * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * g * I_{vh}}$$

Der g -Faktor wird durch die Messung eines frei beweglichen Kontrollfluorophors bei der gleichen Anregungs- und Emissionswellenlänge gemessen. Die durch horizontal polarisierte Anregung erzeugte senkrechte (I_{hv}) und parallele (I_{hh}) Fluoreszenzemissionsintensität wurde bestimmt und mit der Formel $g = I_{hv}/I_{hh}$ berechnet. Der Wert der Anisotropie kann durch Rotationsbewegungen des Fluorophors verändert werden. Homo-FRET-Ereignisse führen zu einer Änderung der Anisotropie. Wird Energie von einem Donor übertragen, werden bevorzugt solche Akzeptormoleküle angeregt, deren Anregungsdipolmoment parallel zum Emissionsdipolmoment des Donors liegen. Da das Donoremissionsdipolmoment meist nicht parallel zum Dipolmoment des Anregungslichts liegt, kommt es zwangsläufig zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität, die parallel zum ursprünglichen Anregungsdipolmoment orientiert ist. Dadurch reduziert sich die Anisotropie. Wie in Abbildung 48 zu sehen, verändern sich die Anteile an paralleler und senkrechter Polarisation (relativ zum Dipolmoment des Anregungslichts) abhängig davon, ob durch räumliche Nähe ein Homo-FRET-Ereignis auftreten kann (links) oder ob eine zu große Entfernung ein Homo-FRET-Ereignis verhindert (rechts). Die resultierende Anisotropie ist schematisch im mittleren Diagramm dargestellt.

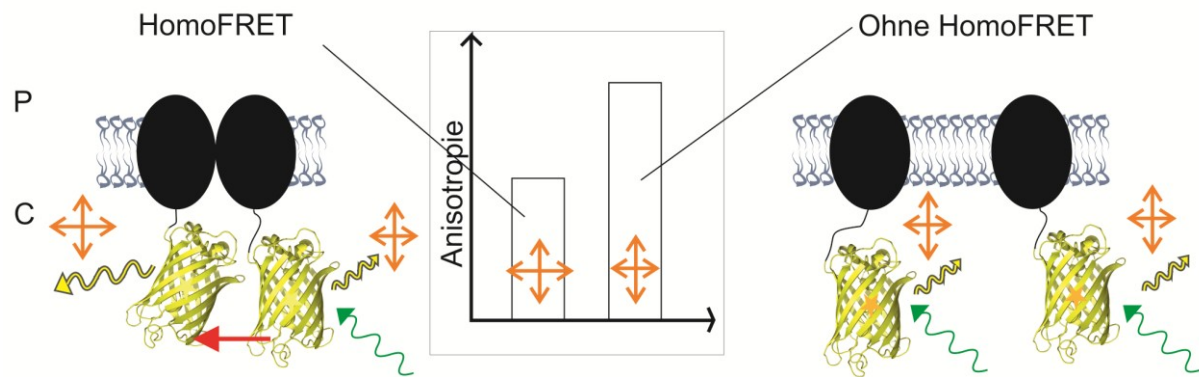


Abbildung 48: Schematische Darstellung des Homo-FRET (modifiziert nach Ziolkowska *et al.* 2012). Energietransfer findet zwischen identischen Fluorophoren (mYFP gelb) statt, die an das membranständige BioY (schwarz) fusioniert vorliegen. Der direkt angeregte Donor (grüner Pfeil) überträgt bei räumlicher Nähe (links) durch Dipol-Dipol-Resonanz Energie auf den Akzeptor (roter Pfeil). Die Fluoreszenzemission des Akzeptors (großer gelber Pfeil) besitzt eine andere Polarisation als die des Donors (kleiner gelber Pfeil) und dadurch verändern sich die parallelen und senkrechten Anteile der Fluoreszenzemission (relativ zur Polarisation des Anregungslichts; orange Pfeile). Der senkrechte Anteil nimmt im Falle von Homo-FRET zu und reduziert so die Anisotropie, während ohne Homo-FRET (rechts) die parallele Donoremission überwiegt und die Anisotropie höher ausfällt. P: Periplasma, C: Cytoplasma.

In dieser Arbeit wurden rekombinante *E. coli* BL21-Zellen in LB-Medium mit einer Startzellkonzentration von 0,1 (OD_{578}) für 2 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM IPTG zur Induktion der Produktion von mYFP-Fusionsproteinen wurden die Zellen eine weitere Stunde inkubiert, bevor sie 10 Minuten bei 10 °C und 2800 x g zentrifugiert wurden. Die Zellen wurden mit 35 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen, erneut zentrifugiert und in 35 mM Na/K-Phosphatpuffer mit einer finalen OD_{578} von 5 aufgenommen. Direkt vor der Analyse wurden die Proben 1:5 in 35 mM Na/K-Phosphatpuffer verdünnt und 200 μ l wurden bei 23 °C in einem Horriba FluoroMax-4-Spektrophotometer mit Anregungslicht bei 470 nm bestrahlt. Die mYFP-spezifische Fluoreszenzintensität (senkrecht (I_{vh}) und parallel (I_{vv})) wurde bei 520 nm detektiert. Für die Bestimmung des g -Faktors wurde Alexa Fluor 488 in 50 %-igem (v/v) Ethanol verdünnt, ebenfalls mit 470 nm angeregt und die senkrechte (I_{hv}) und parallele (I_{hh}) Fluoreszenzemissionsintensität vermessen. Aus diesen Daten konnte dann nach der genannten Formel die Anisotropie (r) berechnet werden und die Veränderung der Anisotropiewerte der verschiedenen Kontrollen gab Aufschluss über das Auftreten von Homo-FRET-Ereignissen. Es wurden drei 200 μ l Aliquots jeder Probe vermessen.

4.28 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Verbrauchsmittel wurden von den Firmen Bio-Rad, Fisher Scientific, Merck Millipore, Roche Diagnostics, Roth, Sigma-Aldrich, AppliChem, Sarstedt, Hartenstein, MoBiTec, Qiagen, Serva, IBA, VWR und Biozym Diagnostik bezogen. Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden von New England Biolabs, Invitrogen und Roche Diagnostics bezogen. Radionuklide stammen von der Firma Eckert und Ziegler Nuclitec.

4.29 Verwendete Software und Datenbanken

Die Ausarbeitung von Klonierungsstrategien und die Auswertung von Sequenzchromatogrammen erfolgte mit dem Sequenzeditor „ApE v1.11“ (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) und dem „NEBcutter“ (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Multiple Aminosäuresequenzvergleiche wurden unter Verwendung von „Jalview v2.7“ mit „ClustalW“ durchgeführt (Thompson *et al.* 2002). Die Sequenzen annotierter Gene wurden der SEED-Datenbank entnommen (<http://theseed.uchicago.edu/FIG/index.cgi>). Die strukturellen Informationen und PDB-Dateien wurden der RCSB Protein-Datenbank entnommen (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). Die Modellierung von Proteinstrukturen erfolgte mit Hilfe des SWISS-MODEL-Servers (<http://swissmodel.expasy.org/>). Die Bearbeitung von 3D-Modellen von Proteinen wurde mit „Chimera v1.7“ (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) oder „PyMOL v1.3“ (<http://pymol.org/>) durchgeführt. Paarweise auszuführende Proteinstrukturvergleiche wurden mit dem Internetdienst „DaliLite“ (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_lite/start, Hasegawa & Holm 2009) durchgeführt. Die Auswertung und grafische Darstellung numerischer Datenfolgen erfolgte mit „SigmaPlot v10.0“ (<http://www.sigmaplot.com/index.php>) und für statistische t-test-Analysen wurde die Software „GraphPad“ als Internetdienst genutzt (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>). Der Biotingehalt wurde mittels ESI-TOF-Massenspektrometrie mit der „Agilent MassHunter Workstation Software“ berechnet (<http://www.agilent.com/home>). Für die Analyse von Proteinproben mittels Größenausschluss-Chromatografie stand die Software „Unicorn v3.1“ (Amersham) zur Verfügung und die Analyse des Gehalts an Radioaktivität biologischer Proben wurde mit der „QuantaSmart“-Software (<http://quantasmart.software.informer.com/>) durchgeführt. Abbildungen wurden mit der Grafiksoftware „CorelDraw vX6“ (<http://www.coreldraw.com/de/>) ausgearbeitet.

Literaturverzeichnis

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R. & Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**, 610-5.
- Ames, G. F. (1986). Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu Rev Biochem* **55**, 397-425.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**, 2006 0008.
- Bader, A. N., Hoetzel, S., Hofman, E. G., Voortman, J., van Bergen en Henegouwen, P. M., van Meer, G. & Gerritsen, H. C. (2011). Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering. *Chemphyschem* **12**, 475-83.
- Barroga, C. F., Zhang, H., Wajih, N., Bouyer, J. H. & Hermodson, M. A. (1996). The proteins encoded by the *rbs* operon of *Escherichia coli*: I. Overproduction, purification, characterization, and functional analysis of RbsA. *Protein Sci* **5**, 1093-9.
- Bekurtz, J. C. (2011). Untersuchungen zum Oligomerzustand von ECF-Transportern. Bachelorarbeit. *Humboldt-Universität zu Berlin*.
- Berntsson, R. P., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D. J. & Poolman, B. (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* **584**, 2606-17.
- Berntsson, R. P., ter Beek, J., Majsnerowska, M., Duurkens, R. H., Puri, P., Poolman, B. & Slotboom, D. J. (2012). Structural divergence of paralogous S components from ECF-type ABC transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13990-5.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K. & Poolman, B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* **580**, 1023-35.
- Boer, J. L., Mulrooney, S. B. & Hausinger, R. P. (2014). Nickel-dependent metalloenzymes. *Arch Biochem Biophys* **544**, 142-52.
- Böhm, S., Licht, A., Wuttge, S., Schneider, E. & Bordignon, E. (2013). Conformational plasticity of the type I maltose ABC importer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5492-7.
- Bordignon, E., Grote, M. & Schneider, E. (2010). The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century - towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Mol Microbiol* **77**, 1354-66.
- Boudker, O. & Verdon, G. (2010). Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol Sci* **31**, 418-26.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Buckel, S. D., Bell, A. W., Rao, J. K. & Hermodson, M. A. (1986). An analysis of the structure of the product of the *rbsA* gene of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **261**, 7659-62.
- Burgess, C. M., Slotboom, D. J., Geertsma, E. R., Duurkens, R. H., Poolman, B. & van Sinderen, D. (2006). The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism. *J Bacteriol* **188**, 2752-60.
- Cavazza, C., Martin, L., Laffly, E., Lebrétte, H., Cherrier, M. V., Zeppieri, L., Richaud, P., Carrière, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (2011). Histidine 416 of the periplasmic binding protein NikA is essential for nickel uptake in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **585**, 711-5.
- Chai, C., Yu, Y., Zhuo, W., Zhao, H., Li, X., Wang, N., Chai, J. & Yang, M. (2013). Structural basis for a homodimeric ATPase subunit of an ECF transporter. *Protein Cell* **4**, 793-801.
- Cheng, J., Poduska, B., Morton, R. A. & Finan, T. M. (2011). An ABC-type cobalt transport system is essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* at trace metal concentrations. *J Bacteriol* **193**, 4405-16.
- Chivers, P. T. (2015). Nickel recognition by bacterial importer proteins. *Metallomics* **7**, 590-5.
- Chivers, P. T., Benanti, E. L., Heil-Chapdelaine, V., Iwig, J. S. & Rowe, J. L. (2012). Identification of Ni-(L-His)(2) as a substrate for NikABCDE-dependent nickel uptake in *Escherichia coli*. *Metallomics* **4**, 1043-50.
- Choi-Rhee, E. & Cronan, J. E. (2005). Biotin synthase is catalytic *in vivo*, but catalysis engenders destruction of the protein. *Chem Biol* **12**, 461-8.
- Christensen, J. M., Kristiansen, J., Nielsen, N. H., Menne, T. & Byrjalsen, K. (1999). Nickel concentrations in serum and urine of patients with nickel eczema. *Toxicol Lett* **108**, 185-9.

- Cui, J. & Davidson, A. L.** (2011). ABC solute importers in bacteria. *Essays Biochem* **50**, 85-99.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-5.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J.** (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 317-64.
- Dawson, R. J. & Locher, K. P.** (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**, 180-5.
- Dosanjh, N. S. & Michel, S. L.** (2006). Microbial nickel metalloregulation: NikRs for nickel ions. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 123-30.
- Duurkens, R. H., Tol, M. B., Geertsma, E. R., Permentier, H. P. & Slotboom, D. J.** (2007). Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU. *J Biol Chem* **282**, 10380-6.
- Eitinger, T.** (2013a). Cobalt transporters. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (eds) Encyclopedia of metalloproteins. *Springer, Heidelberg*, 678-682.
- Eitinger, T.** (2013b). Nickel transporters. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (eds) Encyclopedia of metalloproteins. *Springer, Heidelberg*, 1515-1519.
- Eitinger, T.** (2013c). Transport of nickel and cobalt in prokaryotes. In: Culotta V, Scott RA (eds) Metals and cells. Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry. *Wiley, Chichester*, 145-154.
- Eitinger, T. & Mandrand-Berthelot, M. A.** (2000). Nickel transport systems in microorganisms. *Arch Microbiol* **173**, 1-9.
- Eitinger, T., Rodionov, D. A., Grote, M. & Schneider, E.** (2011). Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 3-67.
- Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L. & Smith, J. A.** (2005). Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *Biometals* **18**, 399-405.
- Erkens, G. B., Berntsson, R. P., Fulyani, F., Majsnerowska, M., Vujicic-Zagar, A., Ter Beek, J., Poolman, B. & Slotboom, D. J.** (2011). The structural basis of modularity in ECF-type ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 755-60.
- Erkens, G. B., Majsnerowska, M., Ter Beek, J. & Slotboom, D. J.** (2012). Energy coupling factor-type ABC transporters for vitamin uptake in prokaryotes. *Biochemistry* **51**, 4390-6.
- Erkens, G. B. & Slotboom, D. J.** (2010). Biochemical characterization of ThiT from *Lactococcus lactis*: a thiamin transporter with picomolar substrate binding affinity. *Biochemistry* **49**, 3203-12.
- Eudes, A., Erkens, G. B., Slotboom, D. J., Rodionov, D. A., Naponelli, V. & Hanson, A. D.** (2008). Identification of genes encoding the folate- and thiamine-binding membrane proteins in Firmicutes. *J Bacteriol* **190**, 7591-4.
- Farrugia, M. A., Macomber, L. & Hausinger, R. P.** (2013). Biosynthesis of the urease metallocenter. *J Biol Chem* **288**, 13178-85.
- Finkenwirth, F.** (2009). Interaktionsstudien an Komponenten des prokaryotischen Biotintransporters BioMNY mithilfe von Fluoreszenzmethoden. Bachelorarbeit. *Humboldt-Universität zu Berlin*.
- Finkenwirth, F.** (2013). Konstruktion eines biotinauxotrophen und -aufnahmedefizienten *Escherichia coli*-Stammes mit konditionalen Letalmutationen als Indikator für Biotintransportvorgänge. Projektstudie, Forschungsbericht zum Projektmodul *Humboldt-Universität zu Berlin*.
- Finkenwirth, F., Kirsch, F. & Eitinger, T.** (2013). Solitary BioY proteins mediate biotin transport into recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **195**, 4105-11.
- Finkenwirth, F., Neubauer, O., Gunzenhauser, J., Schoknecht, J., Scolari, S., Stockl, M., Korte, T., Herrmann, A. & Eitinger, T.** (2010). Subunit composition of an energy-coupling-factor-type biotin transporter analysed in living bacteria. *Biochem J* **431**, 373-80.
- Finkenwirth, F., Sippach, M., Landmesser, H., Kirsch, F., Ogienko, A., Grunzel, M., Kiesler, C., Steinhoff, H. J., Schneider, E. & Eitinger, T.** (2015). ATP-dependent Conformational Changes Trigger Substrate Capture and Release by an ECF-type Biotin Transporter. *J Biol Chem* **290**, 16929-42.
- Fisher, D. J., Fernandez, R. E., Adams, N. E. & Maurelli, A. T.** (2012). Uptake of biotin by *Chlamydia* spp. through the use of a bacterial transporter (BioY) and a host-cell transporter (SMVT). *PLoS One* **7**, e46052.
- Forrest, L. R. & Rudnick, G.** (2009). The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. *Physiology (Bethesda)* **24**, 377-86.

- Fulyani, F., Schuurman-Wolters, G. K., Zagar, A. V., Guskov, A., Slotboom, D. J. & Poolman, B. (2013). Functional diversity of tandem substrate-binding domains in ABC transporters from pathogenic bacteria. *Structure* **21**, 1879-88.
- Georgieva, E. R., Borbat, P. P., Ginter, C., Freed, J. H. & Boudker, O. (2013). Conformational ensemble of the sodium-coupled aspartate transporter. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 215-21.
- Hänelt, I., Wunnicke, D., Bordignon, E., Steinhoff, H. J. & Slotboom, D. J. (2013). Conformational heterogeneity of the aspartate transporter Glt(Ph). *Nat Struct Mol Biol* **20**, 210-4.
- Harford, C. & Sarkar, B. (1995). Neuromedin C binds Cu(II) and Ni(II) via the ATCUN motif: implications for the CNS and cancer growth. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 877-82.
- Harrison, F. H. & Harwood, C. S. (2005). The pimFABCDE operon from *Rhodospseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiology* **151**, 727-36.
- Hasegawa, H. & Holm, L. (2009). Advances and pitfalls of protein structural alignment. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 341-8.
- Hebbeln, P. (2008). Untersuchungen zur Struktur und Funktion primär und sekundär aktiver Transporter für Übergangsmetallkationen – ein neuartiger Mechanismus der Substrataufnahme in Prokaryoten. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Hebbeln, P., Rodionov, D. A., Alfandega, A. & Eitinger, T. (2007). Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2909-14.
- Henderson, G. B. & Zevely, E. M. (1978). Binding and transport of thiamine by *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol* **133**, 1190-6.
- Henderson, G. B., Zevely, E. M. & Huennekens, F. M. (1976). Folate transport in *Lactobacillus casei*: solubilization and general properties of the binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **68**, 712-7.
- Henderson, G. B., Zevely, E. M. & Huennekens, F. M. (1977a). Purification and properties of a membrane-associated, folate-binding protein from *Lactobacillus casei*. *J Biol Chem* **252**, 3760-5.
- Henderson, G. B., Zevely, E. M. & Huennekens, F. M. (1979a). Coupling of energy to folate transport in *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol* **139**, 552-9.
- Henderson, G. B., Zevely, E. M. & Huennekens, F. M. (1979b). Mechanism of folate transport in *Lactobacillus casei*: evidence for a component shared with the thiamine and biotin transport systems. *J Bacteriol* **137**, 1308-14.
- Herbst, R. W., Perovic, I., Martin-Diaconescu, V., O'Brien, K., Chivers, P. T., Pochapsky, S. S., Pochapsky, T. C. & Maroney, M. J. (2010). Communication between the zinc and nickel sites in dimeric HypA: metal recognition and pH sensing. *J Am Chem Soc* **132**, 10338-51.
- Heuveling, J., Frochaux, V., Ziolkowska, J., Wawrzinek, R., Wessig, P., Herrmann, A. & Schneider, E. (2014). Conformational changes of the bacterial type I ATP-binding cassette importer HisQMP2 at distinct steps of the catalytic cycle. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 106-16.
- Higgins, K. A., Hu, H. Q., Chivers, P. T. & Maroney, M. J. (2013). Effects of select histidine to cysteine mutations on transcriptional regulation by *Escherichia coli* RcnR. *Biochemistry* **52**, 84-97.
- Hohl, M., Briand, C., Grutter, M. G. & Seeger, M. A. (2012). Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 395-402.
- Holland, I. B. (2011). ABC transporters, mechanisms and biology: an overview. *Essays Biochem* **50**, 1-17.
- Holm, L. & Rosenstrom, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545-9.
- Howlett, R. M., Hughes, B. M., Hitchcock, A. & Kelly, D. J. (2012). Hydrogenase activity in the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* depends upon a novel ABC-type nickel transporter (NikZYXWV) and is SlyD-independent. *Microbiology* **158**, 1645-55.
- Iwig, J. S., Leitch, S., Herbst, R. W., Maroney, M. J. & Chivers, P. T. (2008). Ni(II) and Co(II) sensing by *Escherichia coli* RcnR. *J Am Chem Soc* **130**, 7592-606.
- Johnson, R. C., Hu, H. Q., Merrell, D. S. & Maroney, M. J. (2015). Dynamic HypA zinc site is essential for acid viability and proper urease maturation in *Helicobacter pylori*. *Metallomics* **7**, 674-82.
- Kaluarachchi, H., Altenstein, M., Sugumar, S. R., Balbach, J., Zamble, D. B. & Haupt, C. (2012). Nickel binding and [NiFe]-hydrogenase maturation by the metallochaperone SlyD with a single metal-binding site in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **417**, 28-35.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y. & Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* **9**, e0153.

- Karpowich, N. K., Song, J. M., Cocco, N. & Wang, D. N. (2015). ATP binding drives substrate capture in an ECF transporter by a release-and-catch mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 565-71.
- Karpowich, N. K. & Wang, D. N. (2013). Assembly and mechanism of a group II ECF transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2534-9.
- Ketner, G. & Campbell, A. (1974). A deletion mutation placing the galactokinase gene of *Escherichia coli* under control of the biotin promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 2698-702.
- Khare, D., Oldham, M. L., Orelle, C., Davidson, A. L. & Chen, J. (2009). Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Mol Cell* **33**, 528-36.
- Kiesler, C. (2013). Bedeutung der ersten Transmembranhelix von BioY für Protein-Protein Interaktionen in einem Biotintransporter. Bachelorarbeit. *Humboldt-Universität zu Berlin*.
- Kirsch, F. & Eitinger, T. (2014). Transport of nickel and cobalt ions into bacterial cells by S components of ECF transporters. *Biometals* **27**, 653-60.
- Kirsch, F., Frielingsdorf, S., Pohlmann, A., Ziomkowska, J., Herrmann, A. & Eitinger, T. (2012). Essential amino acid residues of BioY reveal that dimers are the functional S unit of the *Rhodobacter capsulatus* biotin transporter. *J Bacteriol* **194**, 4505-12.
- Kobayashi, M. & Shimizu, S. (1999). Cobalt proteins. *Eur J Biochem* **261**, 1-9.
- Korkhov, V. M., Mireku, S. A. & Locher, K. P. (2012). Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD-F. *Nature* **490**, 367-72.
- Korkhov, V. M., Mireku, S. A., Veprintsev, D. B. & Locher, K. P. (2014). Structure of AMP-PNP-bound BtuCD and mechanism of ATP-powered vitamin B12 transport by BtuCD-F. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 1097-9.
- Koutmos, M., Datta, S., Patridge, K. A., Smith, J. L. & Matthews, R. G. (2009). Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18527-32.
- Kretzschmar, T., Burla, B., Lee, Y., Martinoia, E. & Nagy, R. (2011). Functions of ABC transporters in plants. *Essays Biochem* **50**, 145-60.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M. & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 449-+.
- Laussac, J. P. & Sarkar, B. (1984). Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* **23**, 2832-8.
- Lebrette, H., Borezee-Durant, E., Martin, L., Richaud, P., Boeri Erba, E. & Cavazza, C. (2015). Novel insights into nickel import in *Staphylococcus aureus*: the positive role of free histidine and structural characterization of a new thiazolidine-type nickel chelator. *Metallomics* **7**, 613-21.
- Lebrette, H., Brochier-Armanet, C., Zambelli, B., de Reuse, H., Borezee-Durant, E., Ciurli, S. & Cavazza, C. (2014). Promiscuous nickel import in human pathogens: structure, thermodynamics, and evolution of extracytoplasmic nickel-binding proteins. *Structure* **22**, 1421-32.
- Lebrette, H., Iannello, M., Fontecilla-Camps, J. C. & Cavazza, C. (2013). The binding mode of Ni-(L-His)₂ in NikA revealed by X-ray crystallography. *J Inorg Biochem* **121**, 16-8.
- Lee, C. W., Chakravorty, D. K., Chang, F. M., Reyes-Caballero, H., Ye, Y., Merz, K. M., Jr. & Giedroc, D. P. (2012). Solution structure of *Mycobacterium tuberculosis* NmtR in the apo state: insights into Ni(II)-mediated allostery. *Biochemistry* **51**, 2619-29.
- Lee, M., Choi, Y., Burla, B., Kim, Y. Y., Jeon, B., Maeshima, M., Yoo, J. Y., Martinoia, E. & Lee, Y. (2008). The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat Cell Biol* **10**, 1217-23.
- Li, J., Jaimes, K. F. & Aller, S. G. (2014). Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci* **23**, 34-46.
- Lin, S. & Cronan, J. E. (2011). Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. *Mol Biosyst* **7**, 1811-21.
- Linton, K. J. & Higgins, C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**, 5-13.
- Locher, K. P. (2009). Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 239-45.
- Locher, K. P., Lee, A. T. & Rees, D. C. (2002). The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**, 1091-8.
- Loo, T. W., Bartlett, M. C. & Clarke, D. M. (2006a). Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket. *Biochem J* **399**, 351-9.

- Loo, T. W., Bartlett, M. C. & Clarke, D. M. (2006b). Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket. *Biochem J* **396**, 537-45.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Mackie, A., Paley, S., Keseler, I. M., Shearer, A., Paulsen, I. T. & Karp, P. D. (2014). Addition of *Escherichia coli* K-12 growth observation and gene essentiality data to the EcoCyc database. *J Bacteriol* **196**, 982-8.
- Macomber, L. & Hausinger, R. P. (2011). Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* **3**, 1153-62.
- Majsnerowska, M., Hanelt, I., Wunnicke, D., Schafer, L. V., Steinhoff, H. J. & Slotboom, D. J. (2013). Substrate-induced conformational changes in the S-component ThiT from an energy coupling factor transporter. *Structure* **21**, 861-7.
- Mao, B., Pear, M. R., McCammon, J. A. & Quijcho, F. A. (1982). Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-flytrap" model. *J Biol Chem* **257**, 1131-3.
- Marsh, D. (2007). Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys J* **93**, 3884-99.
- McCall, K. A. & Fierke, C. A. (2000). Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals. *Anal Biochem* **284**, 307-15.
- Moody, J. E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J. F. & Thomas, P. J. (2002). Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* **277**, 21111-4.
- Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M. L. & Tieleman, D. P. (2008). ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1757-71.
- Mulrooney, S. B., Pankratz, H. S. & Hausinger, R. P. (1989). Regulation of gene expression and cellular localization of cloned *Klebsiella aerogenes* (*K. pneumoniae*) urease. *J Gen Microbiol* **135**, 1769-76.
- Neubauer, O. (2013). Stöchiometrie und Interaktionen der Untereinheiten von ECF-Transportern. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Neubauer, O., Alfandega, A., Schoknecht, J., Sternberg, U., Pohlmann, A. & Eitinger, T. (2009). Two essential arginine residues in the T components of energy-coupling factor transporters. *J Bacteriol* **191**, 6482-8.
- Neubauer, O., Reiffler, C., Behrendt, L. & Eitinger, T. (2011). Interactions among the A and T units of an ECF-type biotin transporter analyzed by site-specific crosslinking. *PLoS One* **6**, e29087.
- Neupane, K. P., Aldous, A. R. & Kritzer, J. A. (2014). Metal-binding and redox properties of substituted linear and cyclic ATCUN motifs. *J Inorg Biochem* **139**, 65-76.
- Noinaj, N. & Buchanan, S. K. (2014). Structural insights into the transport of small molecules across membranes. *Curr Opin Struct Biol* **27C**, 8-15.
- Nordin, N., Guskov, A., Phua, T., Sahaf, N., Xia, Y., Lu, S., Eshaghi, H. & Eshaghi, S. (2013). Exploring the structure and function of *Thermotoga maritima* CorA reveals the mechanism of gating and ion selectivity in Co²⁺/Mg²⁺ transport. *Biochem J* **451**, 365-74.
- Ogienko, A. (2014). Interaktion zweier Untereinheiten eines Biotin-Transporters vom ECF-Typ während des Katalyse-Zyklus. Bachelorarbeit. Humboldt Universität zu Berlin.
- Oldham, M. L. & Chen, J. (2011a). Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15152-6.
- Oldham, M. L., Khare, D., Quijcho, F. A., Davidson, A. L. & Chen, J. (2007). Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* **450**, 515-21.
- Oswald, C., Holland, I. B. & Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**, 385-99.
- Pang, K., Li, Y., Liu, M., Meng, Z. & Yu, Y. (2013). Inventory and general analysis of the ATP-binding cassette (ABC) gene superfamily in maize (*Zea mays* L.). *Gene* **526**, 411-28.
- Paulsen, I. T., Nguyen, L., Sliwinski, M. K., Rabus, R. & Saier, M. H., Jr. (2000). Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J Mol Biol* **301**, 75-100.
- Pei, X., Wang, Q., Li, C., Yin, X., Chen, R. & Xie, T. (2013). Addition of Co(2+) to culture medium decides the functional expression of a recombinant nitrile hydratase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **35**, 1419-24.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-56.

- Phillips, C. M., Schreiter, E. R., Stultz, C. M. & Drennan, C. L.** (2010). Structural basis of low-affinity nickel binding to the nickel-responsive transcription factor NikR from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **49**, 7830-8.
- Polacco, J. C., Mazzafera, P. & Tezotto, T.** (2013). Opinion: nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Sci* **199-200**, 79-90.
- Quioco, F. A. & Ledvina, P. S.** (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol* **20**, 17-25.
- Ren, Q. & Paulsen, I. T.** (2005). Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput Biol* **1**, e27.
- Reyes-Caballero, H., Lee, C. W. & Giedroc, D. P.** (2011). *Mycobacterium tuberculosis* NmtR harbors a nickel sensing site with parallels to *Escherichia coli* RcnR. *Biochemistry* **50**, 7941-52.
- Reyes, N., Ginter, C. & Boudker, O.** (2009). Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature* **462**, 880-5.
- Rice, A. J., Alvarez, F. J., Davidson, A. L. & Pinkett, H. W.** (2014b). Effects of lipid environment on the conformational changes of an ABC importer. *Channels (Austin)* **8**, 327-33.
- Rice, A. J., Park, A. & Pinkett, H. W.** (2014a). Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**, 426-37.
- Ringlstetter, S. L.** (2010). Identification of the biotin transporter in *Escherichia coli*, biotinylation of histones in *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. *Universität Regensburg*.
- Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Eudes, A., ter Beek, J., Rodionova, I. A., Erkens, G. B., Slotboom, D. J., Gelfand, M. S., Osterman, A. L., Hanson, A. D. & Eitinger, T.** (2009). A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J Bacteriol* **191**, 42-51.
- Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand, M. S. & Eitinger, T.** (2006). Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol* **188**, 317-27.
- Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S.** (2002). Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in Eubacteria and Archaea. *Genome Res* **12**, 1507-16.
- Roth, J. R., Lawrence, J. G., Rubenfield, M., Kieffer-Higgins, S. & Church, G. M.** (1993). Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella Typhimurium*. *J Bacteriol* **175**, 3303-16.
- Saier, M. H., Jr.** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 354-411.
- Saier, M. H., Jr., Reddy, V. S., Tamang, D. G. & Vastermark, A.** (2014). The transporter classification database. *Nucleic Acids Res* **42**, D251-8.
- Sambrook, J. & Russell, D. W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Schagger, H.** (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**, 16-22.
- Schagger, H. & von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
- Scheu, P. D., Liao, Y. F., Bauer, J., Kneuper, H., Basche, T., Unden, G. & Erker, W.** (2010). Oligomeric sensor kinase DcuS in the membrane of *Escherichia coli* and in proteoliposomes: chemical cross-linking and FRET spectroscopy. *J Bacteriol* **192**, 3474-83.
- Schneider, E., Eckey, V., Weidlich, D., Wiesemann, N., Vahedi-Faridi, A., Thaben, P. & Saenger, W.** (2012). Receptor-transporter interactions of canonical ATP-binding cassette import systems in prokaryotes. *Eur J Cell Biol* **91**, 311-7.
- Schneider, E. & Hunke, S.** (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 1-20.
- Schnetz, K. & Rak, B.** (1990a). Beta-glucoside permease represses the *bgl* operon of *Escherichia coli* by phosphorylation of the antiterminator protein and also interacts with glucose-specific enzyme III, the key element in catabolite control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5074-8.
- Shaik, M. M., Cendron, L., Salamina, M., Ruzzene, M. & Zanotti, G.** (2014). *Helicobacter pylori* periplasmic receptor CeuE (HP1561) modulates its nickel affinity via organic metallophores. *Mol Microbiol* **91**, 724-35.

- Siche, S.** (2010). Charakterisierung der zweiteiligen S-Komponente eines Co^{2+} -Transporters vom ECF-Typ. Diplomarbeit. *Humboldt-Universität zu Berlin*.
- Siche, S., Neubauer, O., Hebbeln, P. & Eitinger, T.** (2010). A bipartite S unit of an ECF-type cobalt transporter. *Res Microbiol* **161**, 824-9.
- Singh, D. R., Mohammad, M. M., Patowary, S., Stoneman, M. R., Oliver, J. A., Movileanu, L. & Raicu, V.** (2013). Determination of the quaternary structure of a bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter in living cells. *Integr Biol (Camb)* **5**, 312-23.
- Slotboom, D. J.** (2014). Structural and mechanistic insights into prokaryotic energy-coupling factor transporters. *Nat Rev Microbiol* **12**, 79-87.
- Song, J., Ji, C. & Zhang, J. Z.** (2013). Unveiling the gating mechanism of ECF Transporter RibU. *Sci Rep* **3**, 3566.
- Stolz, J.** (2003). Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **20**, 221-31.
- Stolz, J., Hoja, U., Meier, S., Sauer, N. & Schweizer, E.** (1999). Identification of the plasma membrane H^+ -biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *J Biol Chem* **274**, 18741-6.
- Sydor, A. M., Lebrette, H., Ariyakumaran, R., Cavazza, C. & Zamble, D. B.** (2014). Relationship between Ni(II) and Zn(II) coordination and nucleotide binding by the *Helicobacter pylori* [NiFe]-hydrogenase and urease maturation factor HypB. *J Biol Chem* **289**, 3828-41.
- Tanford, C.** (1982). Simple model for the chemical potential change of a transported ion in active transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2882-4.
- ter Beek, J., Duurkens, R. H., Erkens, G. B. & Slotboom, D. J.** (2011). Quaternary structure and functional unit of energy coupling factor (ECF)-type transporters. *J Biol Chem* **286**, 5471-5.
- ter Beek, J., Guskov, A. & Slotboom, D. J.** (2014). Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* **143**, 419-35.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G.** (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**, Unit 2 3.
- Todd, M. J. & Hausinger, R. P.** (1987). Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*. *J Biol Chem* **262**, 5963-7.
- Tong, L.** (2013). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci* **70**, 863-91.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K. & Nebert, D. W.** (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* **3**, 281-90.
- Vigonsky, E., Ovcharenko, E. & Lewinson, O.** (2013). Two molybdate/tungstate ABC transporters that interact very differently with their substrate binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5440-5.
- von Heijne, G.** (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**, 456-8.
- von Heijne, G.** (2006). Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 909-18.
- Wang, T., Fu, G., Pan, X., Wu, J., Gong, X., Wang, J. & Shi, Y.** (2013). Structure of a bacterial energy-coupling factor transporter. *Nature* **497**, 272-6.
- Weatherburn, M. W.** (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* **39**, 971-974.
- Wen, P. C. & Tajkhorshid, E.** (2011). Conformational coupling of the nucleotide-binding and the transmembrane domains in ABC transporters. *Biophys J* **101**, 680-90.
- Wolfram, L., Friedrich, B. & Eitinger, T.** (1995). The *Alcaligenes eutrophus* protein HoxN mediates nickel transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 1840-3.
- Woo, J. S., Zeltina, A., Goetz, B. A. & Locher, K. P.** (2012). X-ray structure of the *Yersinia pestis* heme transporter HmuUV. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1310-5.
- Xia, Y., Lundback, A. K., Sahaf, N., Nordlund, G., Brzezinski, P. & Eshaghi, S.** (2011). Co^{2+} selectivity of *Thermotoga maritima* CorA and its inability to regulate Mg^{2+} homeostasis present a new class of CorA proteins. *J Biol Chem* **286**, 16525-32.
- Xu, K., Zhang, M., Zhao, Q., Yu, F., Guo, H., Wang, C., He, F., Ding, J. & Zhang, P.** (2013). Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*. *Nature* **497**, 268-71.

- Yu, Y., Zhou, M., Kirsch, F., Xu, C., Zhang, L., Wang, Y., Jiang, Z., Wang, N., Li, J., Eiting, T. & Yang, M.** (2014). Planar substrate-binding site dictates the specificity of ECF-type nickel/cobalt transporters. *Cell Res* **24**, 267-77.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B. & Schmitt, L.** (2005). H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J* **24**, 1901-10.
- Zempleni, J., Wijeratne, S. S. & Hassan, Y. I.** (2009). Biotin. *Biofactors* **35**, 36-46.
- Zhang, M., Bao, Z., Zhao, Q., Guo, H., Xu, K., Wang, C. & Zhang, P.** (2014). Structure of a pantothenate transporter and implications for ECF module sharing and energy coupling of group II ECF transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 18560-5.
- Zhang, P.** (2013). Structure and mechanism of energy-coupling factor transporters. *Trends Microbiol* **21**, 652-9.
- Zhang, P., Wang, J. & Shi, Y.** (2010). Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature* **468**, 717-20.
- Zhang, Y., Rodionov, D. A., Gelfand, M. S. & Gladyshev, V. N.** (2009). Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics* **10**, 78.
- Ziomkowska, J., Kirsch, F., Herrman, A. & Eiting, T.** (2012). Analyse eines unkonventionellen Vitamin-Transporters. *Biospektrum* **18**, 498.
- Zoghbi, M. E. & Altenberg, G. A.** (2013). Hydrolysis at one of the two nucleotide-binding sites drives the dissociation of ATP-binding cassette nucleotide-binding domain dimers. *J Biol Chem* **288**, 34259-65.
- Zoghbi, M. E. & Altenberg, G. A.** (2014). ATP binding to two sites is necessary for dimerization of nucleotide-binding domains of ABC proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **443**, 97-102.
- Zolneric, J. K., Andress, E. J., Nicolaou, M. & Linton, K. J.** (2011). Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* **50**, 43-61.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Eitingер möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner gut ausgestatteten Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich möchte ihm für das überaus interessante Thema sowie für die stete und geduldige Unterstützung in allen fachlichen Belangen danken.

Für die Übernahme der Gutachterfunktion bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Erwin Schneider und Herrn Professor Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff.

Ein sehr herzlicher Dank geht an meine Freundin, Kollegin und Nachbarin Olivia Neubauer, die mich routiniert in den Laboralltag eingeführt, mit Rat und Tat unterstützt und inhaltlich und methodisch jederzeit alle Fragen meinerseits beantwortet hat. Ich danke ihr für die schöne Zeit im *harmony lab* mit gemeinsamem Musikgeschmack, wundervollen und motivierenden Teepausengesprächen und dafür, dass sie meinen Ordnungswahn klaglos ertragen hat. Sie hat mir gezeigt, dass wir alle denselben Weg gehen mussten und es alle schaffen können.

Weiterhin danke ich ganz herzlich Katja Karstens, Steffen Lütte, Stefanie Ganskow, Caspar Schäfer, Friedrich Finkenwirth, Sandra Dittman und Marit Wagler für die fröhlichen Kaffeerunden, die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Kameradschaft in jeder Lebenslage und vor allem für die sehr gute Freundschaft außerhalb des Labors. Durch sie habe ich Berlin schätzen gelernt.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Janna Schoknecht, Josta Hamann und Angelika Strack für die tatkräftige Unterstützung bei allen labortechnischen Fragen und Bestellungen. Ich bedanke mich außerdem bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe der Mikrobiologie von Prof. Dr. Dr. Bärbel Friedrich für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Anne Pohlmann und Herrn Dr. Stefan Frielingsdorf für die kompetente Einführung in die und Unterstützung bei der Massenspektrometrie.

Weiterhin danke ich Friedrich Finkenwirth, Jennifer C. Bekurtz, Cornelia Kiesler und Martin Quenkert für die praktischen und geistigen Beiträge zu dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Herrmann und insbesondere an Joanna Ziomkowska für die hervorragende Unterstützung bei meinen FRET-Messungen im Labor der AG und bei allen aufgetretenen biophysikalischen Problemen.

Den Dank an meine Schwester Yvonne und meine Eltern Sylvia und Volker kann ich nicht in Worte fassen. Ihre Unterstützung war mir immer gewiss, ohne dass ich danach fragen musste. Sie haben mich kontinuierlich motiviert, unterstützt, Klagen meinerseits ertragen und immer an mich geglaubt. Schließlich danke ich meiner Lektorin Yvonne Kirsch für die unauffindbar aufgefundenen Kommas und Rechtschreibfehler.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 08.07.15

Franziska Kirsch

Anhang

Tabelle 12: Zusätzliche, nicht für die Arbeit relevante Primer

Nr.		Name	Sequenz 5'-3'
1	At	At-BioMfor-over	gcgACatgtcaatccggtttcgacgccgccc
2		At-BioNrev-over	GGGTCGTCATGGCGCTCATAACTCCGGATGGTTGTC
3	BioMNY	At-BioNfor-over	GACAACCATCCGGAGTTATGAGCGCCATGACGACCC
4	Sm	At-BioNfor	CCATCACCGTGAGCATTTTCAG
5	BioMNY	At-BioNrev	GATATCGGCAGCCTTCACCAG
6		SmBioMfor_PciI	CGCacATGtctatccgctttaccgattgc
7	L1-S-Ein- heiten	LlacHmpT_NcoIfor	CCGGCGccatggAACTCATGGACAAT
8		LlacHmpT_BglIIrev	CGCCGCGagatctAGCTTTTCTAAATCC
9		LlacNiaX_NcoIfor	CCGccatggGAAACCACGATTGCCC
10		LlacNiaX_BglIIrev	CGCCGCGagatctAATTTTCGGCTTTAACT
11		LlacQueT_NcoIfor	CCGccatggAAAAATCAAAAATTTATG
12		LlacQueT_BglIIrev	CGCagatctACGACTCAAATCAACTC
13		LlacRibU_NcoIfor	CCGccatggCTAAACACGTCGGATG
14		LlacRibU_BglIIrev	CGCagatctAGCATTGTAAAATTTTACTAC
15		LlacThiT_NcoIfor	CCGccatggCTAATTCTAAGTTCAATG
16		LlacThiT_BglIIrev	CGCGCGagatctGTAATTACTATGGAT
17		LlacPanT_PciIfor	CCGacatgtTAAAATCAAAAGCGTC
18		LlacPanT_BglIIrev	CGCagatctTGAATTATTGCGAGCC
19	ΔYigM/ ΔBioH	yigMfor	TGATACTTCGCTACAATGGATACCCG
20		yigMrev	CGAGCAGCGTCAGCCAGTTACGGAAGC
21		metRfor_YigMtest	ATGATCGAAGTAAAACACCTGAAAACGC
22		bioHtestfor	CTGCCATAACGGAACGCTGACGATGCG
23		bioHtestrev	GGCCTGCTTATTAAGTAGTGGATACGC
24		deltabioHfor	CTGTTAGCATATGTTTCATCCTTGTAAGTC
25		deltabioHrev	CAGTAAAGTTCTGTCTCGCCATTTCAAAAGCC
26	BioM	BioM_E161Qfor	ggatcctgttcgacCagcccttcaacgcgc
27		BglII_M_Cysless-	CGGagatctgcccgcggcgccaaagc
28	BioN	Rc-BioN-NdeIfor	caccatatggccgatgccttgccg
29	BioY	BsrGI-Stop-BioY	ccgtgtacaagTAAtggaacgtaacgtaaccctg
30	BioY-AxxxxA	BioY_A12Wrev	cgcgacgatcagcgccCAgaaaagcccgatcag
31		BioY_A13Wrev	cagcgcgacgatcagcCAcgcgaaaagcccgatc
32		BioY_A17Wrev	ggcacgaagcccagcCAgacgatcagcgccgc
33		BioY_A12Vrev	cgcgacgatcagcgccAACgaaaagcccgatcag
34		BioY_A13Vrev	cagcgcgacgatcagAACcgcgaaaagcccgatc
35		BioY_A17Vrev	ggcacgaagcccagAACgacgatcagcgccgc
36		BioY_A13/A17Wrev	ggcacgaagcccagcCAgacgatcagccacgc
37	NikM/CbiM	NikM_D5Efor	ccATGCATATTCCCGAaGGCTATCTGAGCC
38		NikM_P4Mfor	gcccATGCATATTatgGACGGCTATCTGAGC
39		NikM_P4M_D5Efor	gcccATGCATATTatgGAaGGCTATCTGAGC
40		CbiM_E5Dfor	gcccattgcataatcatggacggctatctgcccgtcac
41		CbiM_E5Qfor	gcccattgcataatcatgcagggtatctgcccgtcac



Subklasse II

solitäre BioY



Subklasse II

solitäre BioY

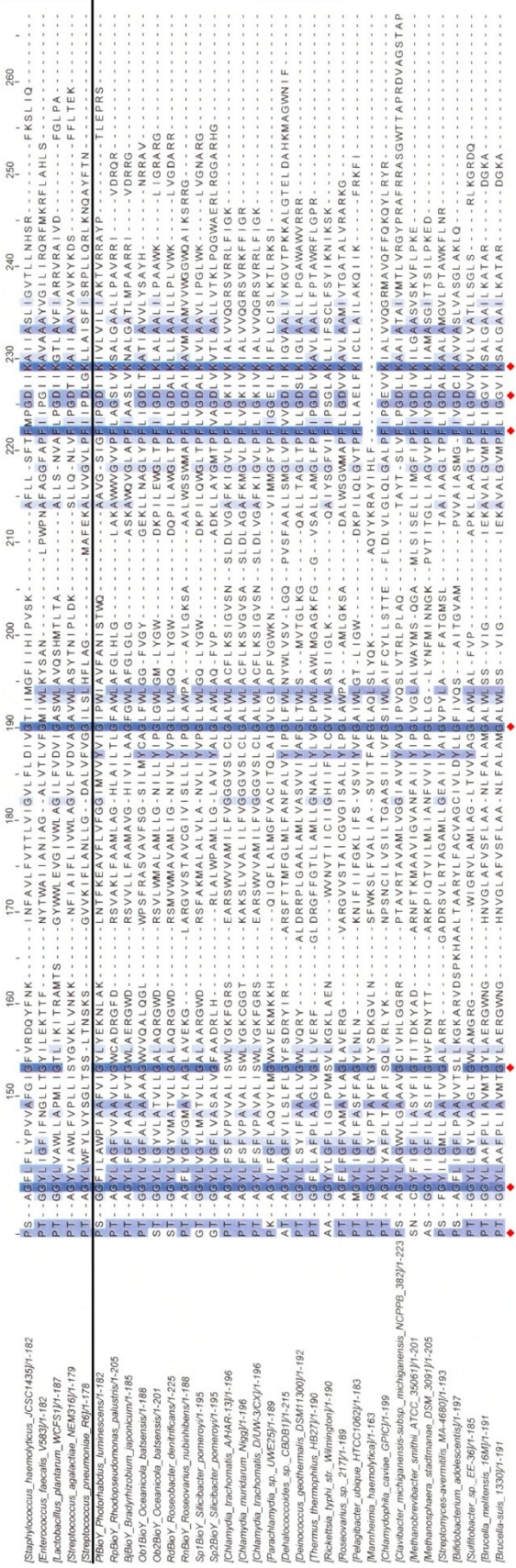


Abbildung 49B: Alignment von insgesamt 70 BioY-Proteinen der Subklassen I und II sowie solitärer BioY-Proteine, Teil B. Die in der Arbeit verwendeten BioY-Proteine sind jeweils in den ersten Spalten der Klasse zu finden. Konservierte Reste >75 % sind rot markiert.

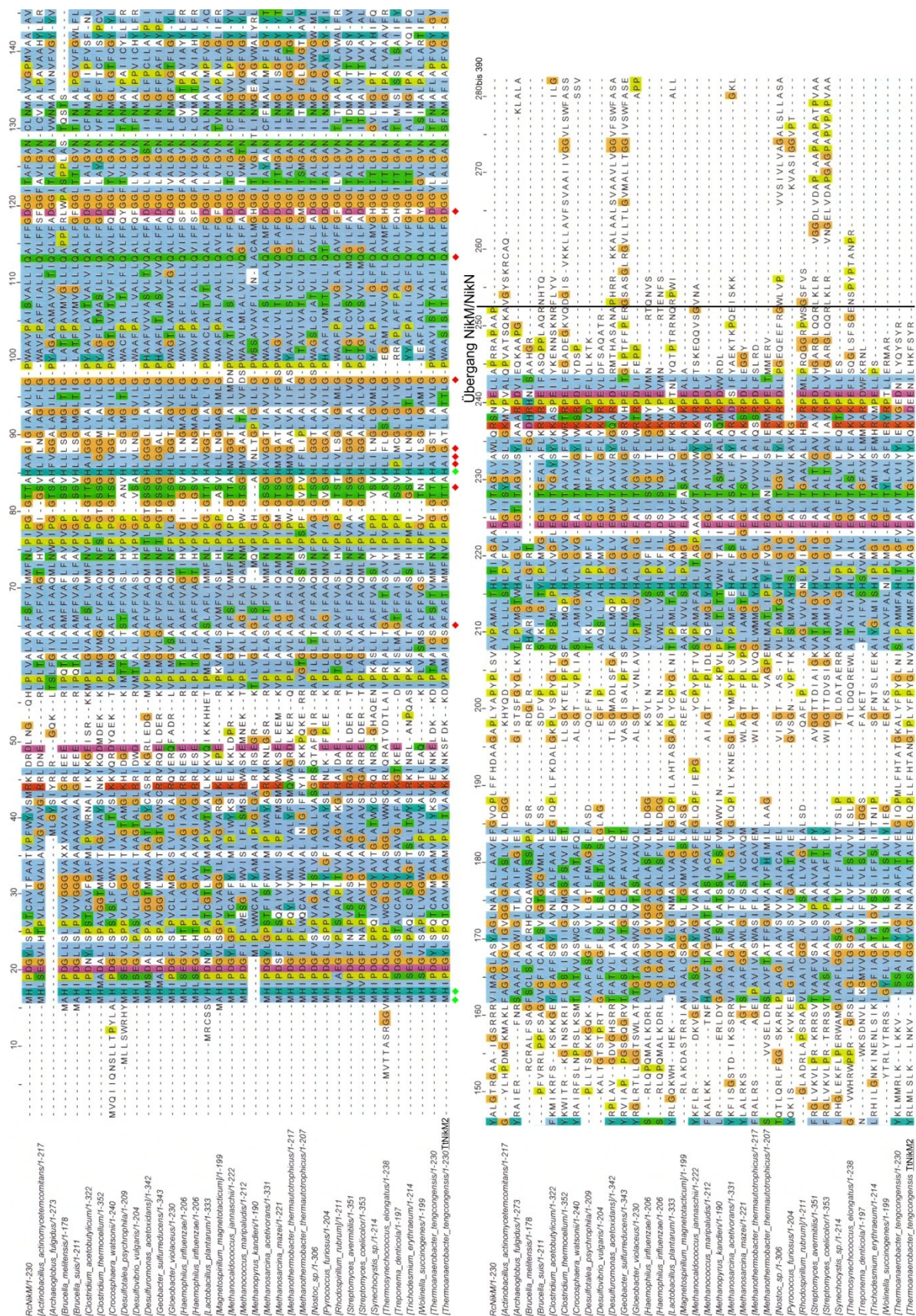


Abbildung 50: Alignment von 36 NikM-Proteinen. Die NikM-Teile wurden verglichen; der NikN-Teil bei fusionierten Varianten wurde entfernt. *Rc*NikM-Teil ist in der ersten, *Tt*NikM2 in der letzten Spalte zu finden. An der Substratbindestelle beteiligte Reste sind grün, andere in der Arbeit erwähnte Reste sind rot markiert.

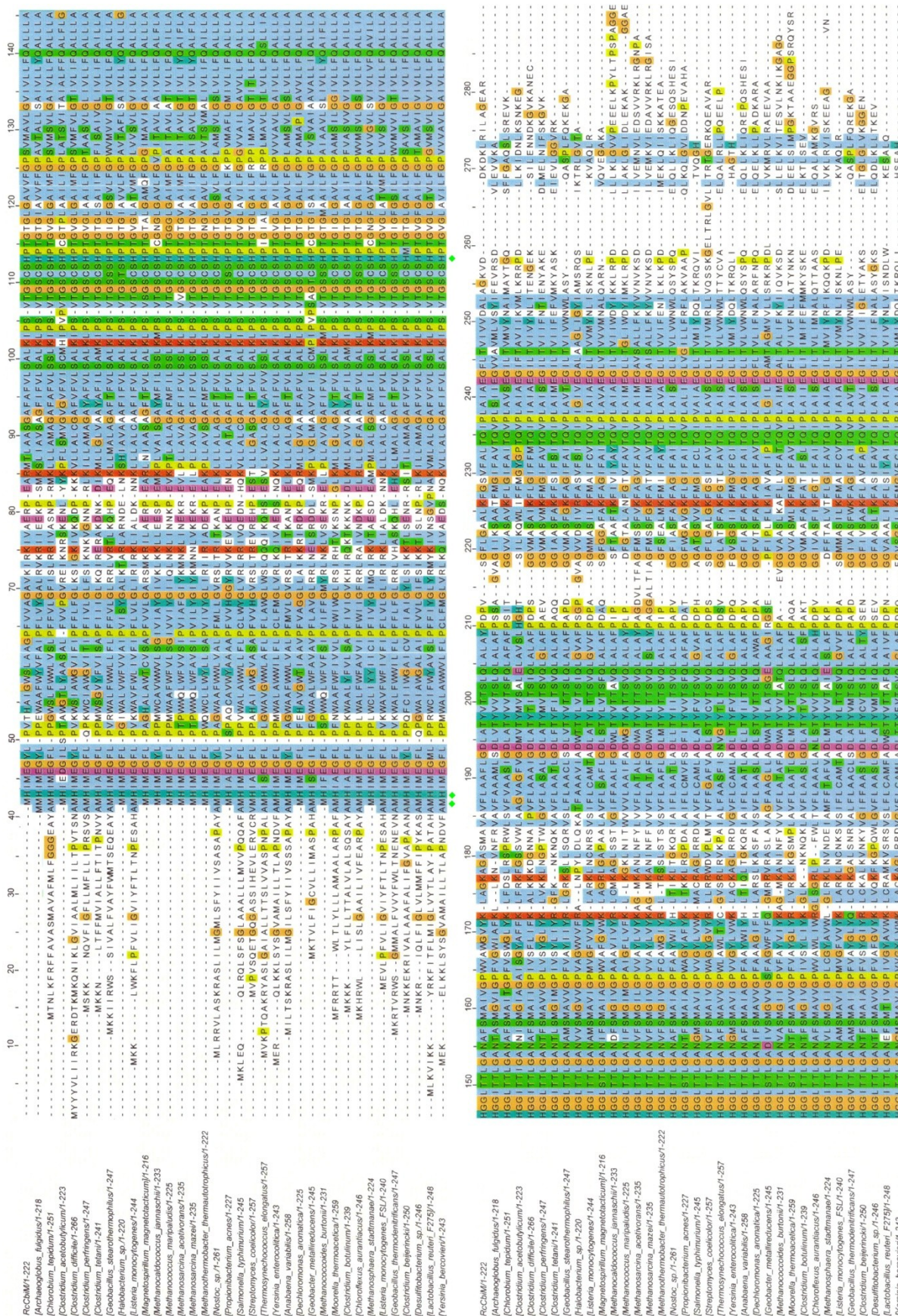


Abbildung 51: Alignment von 36 CbiM-Proteinen. *RcCbiM* ist in der ersten Spalte zu finden. An der Substratbindestelle beteiligte Reste sind grün markiert.